

# ***In vitro*-Untersuchungen zu Parvovirus B19- Proteinkapsiden und deren Rezeptor- Interaktionen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III  
-Biologie und Vorklinische Medizin-  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Bärbel Kaufmann aus Leipzig

Juli 2001

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Bärbel Kaufmann

Promotionsgesuch eingereicht am:

23.Juli 2001

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof.Dr. Robert Seckler

Prüfungsausschuß:

Prof.Dr. Rosemarie Baumann (Vorsitzende)

Prof.Dr. Robert Seckler (1.Gutachter)

Prof.Dr. Susanne Modrow (2.Gutachterin)

Prof.Dr.Dr. Hans Robert Kalbitzer (3.Prüfer)

## Zusammenfassung

Parvovirus B19 ist der einzige bekannte humanpathogene Vertreter der Familie der *Parvoviridae*. Über die genauen Infektions- und Pathogenesemechanismen von Parvovirus B19, einschließlich Zielzellerkennung, ist wenig bekannt, vor allem wegen seines ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen und weil ein geeignetes Zellkultursystems für *in vivo*-Untersuchungen fehlt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die detaillierte biophysikalische Beschreibung der Interaktion von Parvovirus B19 mit dem vorgeschlagenen Rezeptormolekül Globosid, einem Glycosphingolipid an der Zelloberfläche. Als notwendige Voraussetzung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezifischer Antikörper gegen das virale B19-Strukturprotein VP2 zum Einsatz als immobilisierender Träger für Bindungsassays hergestellt und ein Protokoll für die Präparation homogener, rekombinanter B19 VP2-Proteinkapside optimiert.

Zur Charakterisierung der B19 / Globosid-Wechselwirkungen wurden Festphasenassays auf Basis fluoreszenzmarkierter Liposomen oder radioaktiv-markierter Proteinkapside etabliert, die sich in der Art der Präsentation der Bindungspartner und Sensitivität der Bindungsdetektion unterschieden. Als Vergleichssubstanzen wurden in den Experimenten die Glycolipide Globotriaosylceramid, Globopentaosylceramid und asialo-Gangliosid<sub>GM1</sub> eingesetzt. Der Kohlenhydratanteil von Globotriaosyl- bzw. Globopentaosylceramid ist dem von Globosid (Globotetraosylceramid) strukturell verwandt und nur um ein terminales *N*-Acetyl-Galactosamin verkürzt bzw. verlängert. Der Zuckeranteil von asialo-Gangliosid<sub>GM1</sub> besteht aus den gleichen Zuckereinheiten wie der von Globosid, unterscheidet sich aber in Sequenzabfolge und Verknüpfung. Asialo-Gangliosid<sub>GM1</sub> sollte daher vergleichbare physiko-chemische Eigenschaften wie Globotetraosylceramid haben. Die direkten Testsysteme lieferten keine Hinweise auf eine spezifische Parvovirus B19 / Globosid-Interaktion. Die Ergebnisse konnten durch Messungen mit einer hochsensitiven Biosensortechnik (Oberflächen-Plasmonresonanz) und kalorimetrische Untersuchungen verifiziert werden.

Die in den Bindungsassays gewonnenen Daten stehen im Gegensatz zu der klinischen Beobachtung, daß Individuen, die kein Globosid exprimieren, nicht durch Parvovirus B19 infizierbar sind und zu publizierten Hämagglutinationsdaten, die der Hypothese zugrundeliegen, daß Globosid der spezifische, zelluläre Rezeptor von Parvovirus B19 ist. Hämagglutinationsuntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigten die Hemmaktivität von Globosid, zeigten aber auch, daß die des strukturell verwandten Forssman-Glycolipids Globopentaosyl-

ceramid vergleichbar ist und stellten eine hohe Spezifität des Globosid-Kapsid-Kontaktes in Frage.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, daß Globosid nicht als direkter und einziger Rezeptor von Parvovirus B19 agieren kann, aber möglicherweise im Kontext einer Interaktion des Virus mit einem anderen Rezeptormolekül erkannt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher erste Untersuchungen zur Identifizierung anderer Rezeptormoleküle in Membranproteinfraktionen von permissiven und nicht-permissiven humanen Zelllinien auf Basis eines *Virus overlay protein binding*-Assays durchgeführt. In diesen Experimenten wurde die Bindung  $^{125}\text{I}$ -markierter Proteinkapside an mehrere, wahrscheinlich nicht-zelltypspezifische Proteine im Größenbereich von 30 bis 100 kD detektiert. Die Identität dieser Banden ist weitgehend unklar. Die Spezifität der Kapsidinteraktion mit gereinigter Carboanhydrase muß in weiteren Experimenten nachgewiesen werden.

Das einfach gebaute Proteinkapsid von Parvovirus B19 besteht aus nur zwei Strukturproteinen, VP1 und VP2, im Verhältnis von 5 % zu 95 %. Das virale Protein VP2 ist für die Kapsidbildung, aber nicht für die Infektiosität von Parvovirus B19-Virionen ausreichend.

Zu Vergleichszwecken für Bindungsassays und Grundlage für weitere Strukturuntersuchungen wurden heterogene VP1/VP2-Partikel im Baculo/Sf9-System produziert. Um die parallele Transfektion einer Insektenzelle mit beiden heterolog zu exprimierenden Genen zu gewährleisten, wurden ein bicistronischer Baculovirus hergestellt. Zur Vektor-determinierten Variation des Expressionsverhältnisses der Strukturproteine VP1 und VP2 wurden Mutationen in den Promoterbereich der Fremdgen-Expressionskassette des Baculovirus eingeführt. In dieser Arbeit konnten Mischkapside mit VP1-Anteilen von 45 % bzw. 30 % hergestellt werden, wodurch die Funktionalität der Promotermutationsansatzes bestätigt wurde.



## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption oder Ampere
AcMNPV	<i>Autographa californica mononuclear polyhedrosis Virus</i>
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
α-	anti-
AP	Alkalische Phosphatase
ApR	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
asialo-GM1	Asialo-Gangliosid <sub>GM1</sub>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfat; nichtdenaturierendes, zwitterionisches Detergenz, solubilisierend
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
Ci	Curie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i> , Zerfälle pro Minute
cps	<i>counts per second</i> , Signale pro Sekunde
CsCl	Cäsiumchlorid
C-terminal	carboxyterminal
d	Tage
Da	Dalton
dam <sup>-</sup>	Methylierungsdefekt in <i>E.coli</i> (DNA-Adenin-Methylase)
d.h.	das heißt
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
e.c.	Endkonzentration
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
F <sup>-</sup>	Fehlender Fertilitätsfaktor (F'-Episom) in <i>E.coli</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm

## Abkürzungsverzeichnis

---

xg	-fache Erdbeschleunigung
Gb3Cer	Globotriaosylceramid
Gb4Cer	Globosid, Globotetraosylceramid
Gb5Cer	Globopentaosylceramid, Forssman Glykolipid
GdCl	Guanidiniumchlorid
Gly	Glycin
h	Stunde
HA	Hämagglutination
HAI	Inhibierung der Hämagglutination
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
<sup>125</sup> I <sub>2</sub>	Iodmolekül aus radioaktivem Isotop 125
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für β-Galactosidase
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LMP	<i>low melting point</i>
m	Meter
M	Molar (mol/l) oder Molare Masse
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
mAk	Monoklonaler Antikörper
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)chlorid
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Infektionstiter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sup>125</sup> I	Natriumiodid mit Iodisomer 125
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
Na-P-P	Natrium Phosphat-Puffer
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NiCl <sub>2</sub>	Nickelchlorid
Nr.	Nummer
N-terminal	aminoterminal
Ω	Ohm

OD	Optische Dichte
ORI	<i>origin of replication</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH	Konzentrationseinheit für H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion; nach Virusinokulation
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin, $\beta$ -Oleoyl- $\gamma$ -Palmitoyl (C18:1, [cis]-9/C16:0)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pwo-Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus wosei</i>
RbCl	Rubidiumchlorid
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Ovarzelllinie 9
SN1	monomeres Seckler-Nilsson-Globotetraosederivat
SN3	trimeres Seckler-Nilsson-Globotetraosederivat (Version A)
SN4	trimeres Seckler-Nilsson-Globotetraosederivat (Version B)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIU	<i>Trypsin inhibitor unit</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen oder Volt
vol	Volumenteil
VOPBA	<i>virus overlay protein binding assay</i>
VP1	virales Protein 1
VP2	virales Protein 2
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
w/w	Gewicht pro Gewichtseinheit
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	6
1 Einleitung .....	10
<b>1.1 Familie <i>Parvoviridae</i></b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Parvovirus B19: Struktur und Genomorganisation</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Pathogenese und Wirtszelltropismus</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4 Globosid - Zellulärer Rezeptor des Parvovirus B19?</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 Virus-Rezeptor-Wechselwirkungen</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
2 Materialien .....	21
<b>2.1 Chemikalien und Biochemikalien</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Allgemeines .....	21
2.1.2 Oligosaccharide und Glycolipide .....	21
2.1.3 Antikörper .....	22
2.1.4 Molekulargewichtsmarker .....	22
<b>2.2 Puffer und Nährmedien</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3 Organismen</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4 Plasmide und Oligonukleotide</b> .....	<b>25</b>
2.4.1 B19-Sequenzierprimer .....	26
2.4.2 PCR-Primer und Oligonukleotide .....	27
2.4.3 Plasmide .....	28
<b>2.5 Zentrifugen</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6 Datenanalyse</b> .....	<b>29</b>
3 Methoden .....	31
<b>3.1 Bakterien</b> .....	<b>31</b>
3.1.1 Kultivierung und Erhaltung von Bakterien .....	31
3.1.2 Bakterientransformation .....	31

3.1.2.1 Chemische Transformation von <i>E.coli</i> .....	31
3.1.2.2 Transformation von <i>E.coli</i> durch Elektroporation .....	32
<b>3.2 Eukaryotische Zelllinien .....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	32
3.2.2 Einführung von Fremd-DNA in Sf9-Zellen.....	34
3.2.2.1 Transfektion von Sf9-Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA.....	34
3.2.2.2 Baculovirus/Sf9-Expressionssystem .....	34
3.2.3 Zellzählung in der Neubauer-Kammer .....	35
<b>3.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
3.3.1.1 Pwo-Polymerase.....	35
3.3.1.2 <i>Overlap Extension PCR Mutagenesis</i> .....	37
3.3.1.3 QIAquick PCR-Fragmentreinigung .....	38
3.3.2 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.3.3 DNA-Reinigung .....	38
3.3.3.1 Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> .....	38
3.3.3.2 DNA-Extraktion .....	39
3.3.3.3 DNA-Gelextraktion.....	39
3.3.4 dsDNA-Konzentrationsbestimmung .....	39
3.3.5 Restriktion und Ligation von Plasmid-DNA .....	39
3.3.5.1 DNA-Restriktion .....	39
3.3.5.2 5'-Dephosphorylierung.....	39
3.3.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten .....	40
3.3.5.4 Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden.....	40
3.3.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	40
<b>3.4 Herstellung rekombinanter Baculoviren .....</b>	<b>40</b>
3.4.1.1 Transposition von Bacmid-DNA und Blau/Weiß- <i>Screening</i> .....	40
3.4.1.2 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA .....	40
<b>3.5 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.5.1 Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	41
3.5.1.1 Induktion der Proteinexpression in <i>E.coli</i> .....	41
3.5.1.2 Reinigung von [6xHis]-Protein unter denaturierenden Bedingungen .....	41
3.5.1.3 <i>Inclusion body</i> -Reinigung .....	41
3.5.1.4 Membranproteinanreicherung .....	42
3.5.1.5 Kapsidpräparation.....	42
3.5.1.6 Dialyse von Proteinlösungen .....	43
3.5.1.7 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	43

3.5.2 Protein-Gelelektrophorese.....	43
3.5.2.1 Analytische SDS-PAGE.....	43
3.5.2.2 Native diskontinuierliche Gelelektrophorese.....	44
3.5.2.3 2D-Elektrophorese mit immobilisiertem pH-Gradienten .....	44
3.5.2.4 Trocknen von Polyacrylamid-Gelen .....	46
3.5.2.5 Präparative SDS-PAGE: PrepCell .....	46
3.5.3 Proteinfärbung .....	46
3.5.3.1 Coomassiefärbung.....	46
3.5.3.2 Silberfärbung.....	47
3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	47
3.5.4.1 Bradford-Proteinbestimmung.....	47
3.5.4.2 Photometrische Proteinbestimmung.....	47
3.5.4.3 Densitometrische Proteinbestimmung.....	48
3.5.5 WesternBlot-Analyse .....	48
3.5.5.1 Proteintransfer und Immunreaktion .....	48
3.5.5.2 Alkalische Phosphatase.....	49
3.5.5.3 Peroxidase: Diaminobenzidin-Färbung.....	49
3.5.6 Proteinde- und renaturierung zum <i>in vitro</i> -Kapsidassembly .....	49
3.5.6.1 Denaturierungsmittel.....	49
3.5.6.2 Renaturierung .....	50
3.5.7 Gelfiltration zur Renaturierungskontrolle .....	50
3.5.8 Produktion von Kaninchen-Antiserum .....	50
3.5.8.1 Immunisierung von Kaninchen .....	50
3.5.8.2 IgG-Anreicherung aus Serum.....	51
3.5.9 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	51
3.5.9.1 Direkter Kapsid-ELISA.....	51
3.5.9.2 ELISA zur Bestimmung der Serumreaktivität .....	51
3.5.9.3 Alkalische Phosphatase.....	52
3.5.9.4 Peroxidase-Färbung .....	52
3.5.10 <sup>125</sup> I-Kapsidmarkierung.....	52
3.5.11 Liposomenherstellung .....	53
3.5.12 Kapsid-Rezeptor-Bindungsassays (BA) .....	53
3.5.12.1 BA mit fluoreszenz-markierten Liposomen .....	53
3.5.12.2 BA mit radioaktiv-markierten rekombinanten Proteinkapsiden.....	54
3.5.12.3 VOPBA: <i>Virus overlay protein binding assay</i> .....	54
3.5.13 <i>Surface Plasmon Resonance</i> .....	55
3.5.14 Mikrokolorimetrie .....	56
3.5.15 Hämagglutinationsanalyse .....	57
3.5.16 Mikroskopie.....	57

3.5.16.1 Negativkontrastierung und Transmissions-EM.....	57
3.5.16.2 Immunfluoreszenz .....	58
4 Ergebnisse und Diskussion .....	59
<b>4.1 Herstellung eines Kaninchen anti-VP2 Antiserum .....</b>	<b>59</b>
4.1.1 Konstruktion eines Expressionsvektors zur [6xHis]-VP2-Produktion.....	59
4.1.2 Expression und Reinigung von rekombinantem [6xHis]-VP2 .....	61
4.1.3 Immunisierung und Charakterisierung des Antiserums .....	63
<b>4.2 Produktion und Charakterisierung rekombinanter B19-Proteinkapside .....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Herstellung homogener VP2-Kapside in Insektenzellen.....	65
4.2.1.1 Charakterisierung des Baculo/Sf9-Expressionssystems.....	66
4.2.1.2 Etablierung eines Kapsidreinigungsprotokolls.....	67
4.2.1.3 Charakterisierung der rekombinanten VP2-Proteinkapside .....	70
4.2.2 Darstellung heterogener VP1/VP2-Kapside in Insektenzellen.....	76
4.2.2.1 Herstellung rekombinanter Baculoviren zur bicistronischen Expression von VP1 und VP2 in Insektenzellen .....	77
4.2.2.2 Mutation des Promoterbereichs der Expressionskassette von Bac-duVP12.....	81
4.2.2.3 Expression, Reinigung und Charakterisierung der VP1/VP2-Kapside .....	85
4.2.3 Vortests zur <i>in vitro</i> -Assemblierung von VP2-Kapsiden .....	91
4.2.3.1 Konstruktion von Expressionsvektoren zur VP1- und VP2-Produktion in <i>E.coli</i> ..	91
4.2.3.2 Expression und Reinigung von rekombinantem VP2 und erste <i>in vitro</i> - Assemblierungsstudien.....	96
<b>4.3 Charakterisierung der Glycolipid–Kapsid–Interaktion .....</b>	<b>103</b>
4.3.1 Hemmung der durch rekombinante VP2-Proteinkapside induzierten Hämagglutination .....	104
4.3.2 Studien zur Glycolipid-Proteinkapsid-Interaktion in Festphasen-Bindungsassays ...	109
4.3.3 <i>Surface Plasmon Resonance</i> und Mikrokalorimetrie .....	118
<b>4.4 Nachweis möglicher Proteinrezeptoren von Parvovirus B19 .....</b>	<b>123</b>
<b>4.5 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick .....</b>	<b>131</b>
5 Literaturverzeichnis .....	134
<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>143</b>
6 Anhang .....	144
<b>Plasmidsequenzen im Klonierungsbereich .....</b>	<b>144</b>
Danksagung.....	156

# 1 Einleitung

Parvovirus B19 ist der einzige bisher bekannte Vertreter der *Parvoviridae*, der eindeutig humanpathogen ist. Das Virus wurde 1975 bei einer Hepatitis B-Studie in Blutproben normaler Spender gefunden und aufgrund seiner Eigenschaften als Parvovirus eingeordnet (Cossart *et al.*, 1975). Weitere Untersuchungen bestätigten für Parvoviren charakteristische Merkmale. Bislang konnte gezeigt werden, daß Parvovirus B19 das verursachende Agens eines breiten Spektrums von Krankheiten des Menschen ist. Antikörper gegen Parvovirus B19 werden in 40 – 60 % der über 20-jährigen und in über 85 % der über 70-jährigen nachgewiesen.

## 1.1 Familie *Parvoviridae*

Zur Familie *Parvoviridae* gehören kleine, nicht-umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen DNA-Genom, die viele Tiere, einschließlich Vertebraten und Arthropoden infizieren. Die Mitglieder der Subfamilie *Densovirinae* infizieren ausschließlich Insekten, die der Subfamilie *Parvovirinae* Wirbeltiere.

Die *Parvovirinae* sind wiederum in drei Genera unterteilt: *Parvo*-, *Dependo*- und *Erythrovirus*. Die *Dependoviren* können in das Wirtszellgenom integrieren, sich aber nur in Gegenwart eines Helfervirus (Adeno- oder Herpesvirus) produktiv vermehren. Die Replikation der dem Genus *Parvovirus* zugeordneten Viren erfolgt autonom. Auch die *Erythroviren* mit ihrem ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen benötigen kein Helfervirus zur Vermehrung. Charakteristische Vertreter der *Dependoviren* sind die Adeno-assoziierten Viren (AAV), die der *Parvoviren* das *Feline Panleukopeniavirus* FPV (Johnson *et al.*, 1974), das *Canine Parvovirus* CPV (Thomson & Gagnon, 1978) oder das *minute virus of mice* MVM (Astell *et al.*, 1983). Parvovirus B19 ist neben dem *Simian Parvovirus* (O'Sullivan *et al.*, 1994) und einem Parvovirus aus dem *Manchurian Chipmunk* (Yoo *et al.*, 1999) dem Genus *Erythrovirus* zugeordnet.

## 1.2 Parvovirus B19: Struktur und Genomorganisation

Parvovirus B19 ist ein kleines, nichtumhülltes, sphärisches Viruspartikel, bestehend aus einem ikosaedrischen Proteinkapsid und einem einzelsträngigen, circa 5,6 kb großen DNA-Genom positiver oder negativer Orientierung. Die Parvovirus B19-Virionen haben einen Durchmesser von circa 25 nm und bandieren im CsCl-Dichtegradienten bei einer Dichte von 1,36 bis



1,46 g/cm<sup>3</sup> (Cossart *et al.*, 1975; Ozawa *et al.*, 1986; Kajigaya *et al.*, 1989; Agbandje *et al.*, 1991).

Die genomische Organisation und Replikation viraler DNA von Parvovirus B19 ist der anderer Säugetiere infizierender Parvoviren ähnlich. Die zwei Kapsidproteine VP1 und VP2 sind durch Gene auf der rechten Seite (5'-Ende des Negativstranges) und das Nichtstrukturprotein NS1 durch ein Gen auf der linken Seite des Genoms codiert. Der codierende Bereich des Genoms wird durch komplementäre Wiederholungseinheiten (*inverted terminal repeats*) von 383 Basen Länge flankiert, die Haarnadelschleifen ausbilden und bei der Replikation Primerfunktion haben.

Die Transkription des B19-Genoms zeigt einige ungewöhnliche Merkmale im Vergleich zu anderen Parvoviren (Abbildung 1). Mindestens 9 überlappende polyadenylierte Transkripte wurden in infizierten Zellen detektiert, die alle durch den starken *p6* Promotor am 3'-Ende des Negativstranges initiiert werden. Weitere Besonderheiten sind das Vorhandensein sehr großer Intronbereiche in den rechtsseitig codierten RNAs und von zwei einzigartigen Transkripten aus der Mitte des Genoms, deren Funktion unbekannt ist.

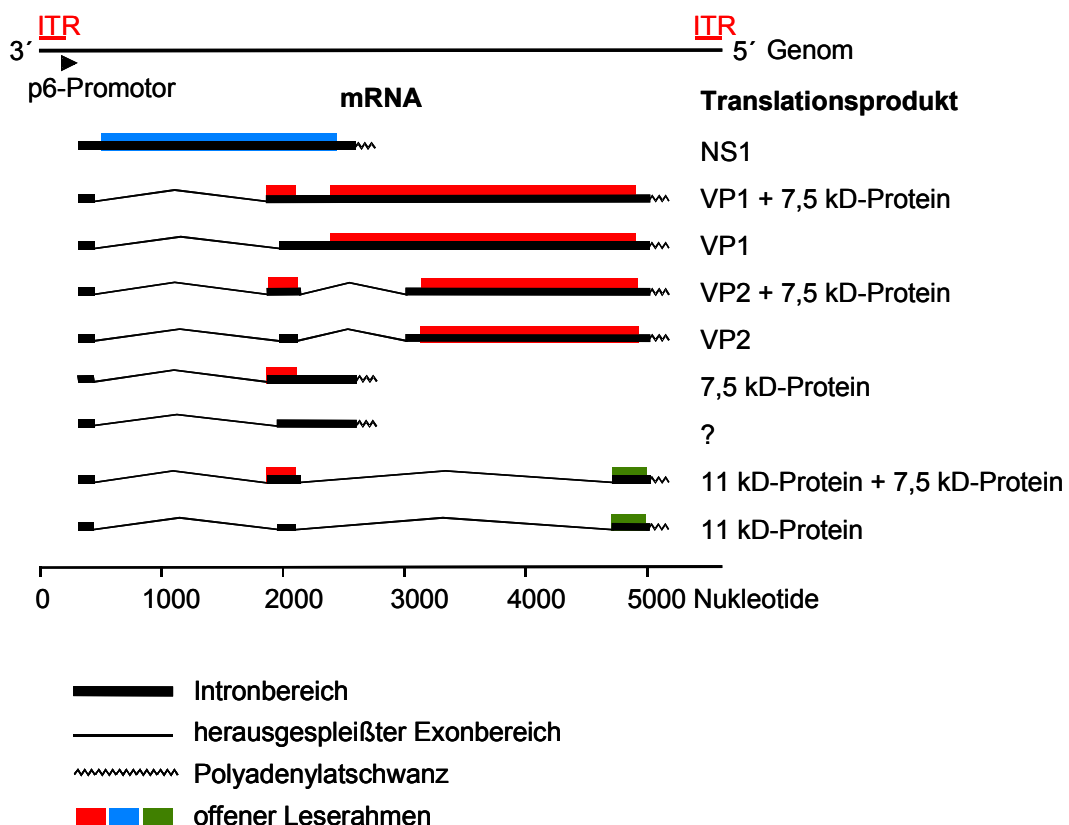


Abbildung 1: Transkriptionskarte von Parvovirus B19 mit Angabe der offenen Leseraster nach Ozawa *et al.* (Ozawa *et al.*, 1987). ITR: *inverted terminal repeats*.

Im Gegensatz zur Cotermination anderer Parvoviren besitzt das B19-Genom zwei separate Transkriptions-Terminationstellen. Die ungewöhnlichen Polyadenylierungssignale in der Mitte des Genoms (ATTAAA oder AATAAC) werden wahrscheinlich durch drei Transkripte gemeinsam genutzt (Ozawa *et al.*, 1987). Die Aktivität des *p6*-Promoters ist nicht von der Permissivität oder Nicht-Permissivität einer Zelllinie abhängig (Liu *et al.*, 1991; Gareus *et al.*, 1998). In permissiven Zellen ist aber das Transkriptionslevel der Strukturgene gegenüber dem NS1-Gen deutlich dominierend, während die Überexpression des NS1-Gens in nicht-permissiven Zellen den Zelltod induziert (Liu *et al.*, 1992; Morey *et al.*, 1992; Pallier *et al.*, 1997). Dies läßt vermuten, daß das relative Auftreten der Transkripte durch post-transkriptionelle Ereignisse, wie alternatives Spleißen, aktive 3'-Prozessierung und durch die Erkennung verschiedener Terminationssignale reguliert wird (Ozawa *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1992).

Fünf der von den mRNAs translatierten Proteine wurden bislang beschrieben. Die einzige nichtgespleißte mRNA codiert für das cytotoxisch wirkende Nichtstrukturprotein NS1 (77 kD), ein Multifunktionsprotein mit regulatorischen und transaktivierenden Eigenschaften. NS1-Proteine sind phosphoryliert und im Zellkern der Wirtszelle lokalisiert (Ozawa *et al.*, 1988a; Momoeda *et al.*, 1994). Für das NS1-Protein des *minute virus of mice* wurde *in vitro* eine ATP-abhängige Helikaseaktivität gezeigt (Jindal *et al.*, 1994). Mindestens zwei virale 11 kD-Proteine wurden in B19-infizierten Knochenmarkszellen nachgewiesen. Diese kleinen Nichtstrukturproteine haben möglicherweise regulatorische Funktionen. Kleine regulatorische Proteine sind auch in anderen Virussystemen für Transaktivierungen oder intrazelluläre Transportprozesse von Bedeutung, beispielsweise Tat und Rev bei HIV-1 (St Amand & Astell, 1993).

Das T=1 Proteinkapsid (Caspar & Klug, 1962) von Parvovirus B19 wird von den zwei Strukturproteinen VP1 (781 AS; 83 kD) und VP2 (554 AS; 58 kD) gebildet. Das virale Protein VP1 unterscheidet sich von VP2 nur in einer 227 AS langen N-terminalen Verlängerung, der *unique region*. Transkriptionelle und translationale Kontrolle führten in infizierten Zellen zu einem sehr geringen Anteil VP1 am Gesamtkapsidprotein (Ozawa *et al.*, 1988b). Die aus 60 Untereinheiten aufgebauten ikosaedrischen Partikel viraler Präparationen enthalten circa 95 % VP2 und 5 % VP1 (Ozawa *et al.*, 1988b).

Die Kristallstruktur leerer Proteinkapside wurde bis zu einer Auflösung von 8 Å geklärt (Agbandje *et al.*, 1994). Charakteristisches Strukturmotiv der Kapsidproteine scheint auch bei Parvovirus B19 ein achtsträngiges anti-paralleles  $\beta$ -barrel zu sein. Die Oberfläche des Kapsids wird vor allem durch große *loop*-Regionen gebildet, die die  $\beta$ -Stränge miteinander verbinden. Immundaten lassen vermuten, daß sich die *unique region* von VP1 an der Kapsidoberfläche befindet (Kajigaya *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992). Die Oberflächeneigenschaften von Parvovirus B19 unterscheiden sich deutlich von CPV und FPV. B19-Partikel haben an der Dreifach-Symmetrieachse eine leichte Vertiefung anstatt eines prominenten, an der Wirtszell-

erkennung und Antigenität beteiligten Dorns und keinen Kanal an der Fünffach-Symmetrieachse (Agbandje *et al.*, 1994).

### 1.3 Pathogenese und Wirtszelltropismus

Parvovirus B19 ist ein verbreitetes humanpathogenes Virus. Im allgemeinen verursacht es die mild verlaufende Kinderkrankheit Ringelröteln (*Erythema infectiosum*), die häufig durch ein auffälliges Exanthem im Gesichtsbereich gekennzeichnet ist (Anderson *et al.*, 1983). Das B19-Virus kann aber auch ein breites Spektrum ernsterer Symptome in Personen mit hämatolytischen Erkrankungen, in immunsupprimierten Patienten, aber auch in normalen, immunkompetenten Individuen verursachen. Die klinischen Manifestationen reichen von akuten oder persistierenden Arthropathien bis zu kritischen Ausfällen in der Produktion roter Blutkörperchen (aplastische Krisen). In einigen Fällen ist die Infektion mit Thrombocytopenien, Myokarditiden oder Hepatitiden assoziiert. B19-Infektionen in der Schwangerschaft können zu *Hydrops fetalis* oder sogar zum Abort führen (Modrow, 2001).

Verursachendes Agens dieser Komplikationen ist der einzige bekannte humanpathogene Vertreter der *Parvoviridae* mit einem ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen (Abbildung 2). Nach Infektion von humanen Knochenmarkszellen wird die Bildung von erythroiden, aber nicht die von myeloiden Kolonien inhibiert (Mortimer *et al.*, 1983). Die Virusproduktion in Knochenmarkskulturen ist proportional zum Gehalt erythroider Vorläuferzellen und die Replikation wird durch Erythropoietin (EPO) signifikant erhöht. Diese Ergebnisse implizieren, daß die Zielzellen von Parvovirus B19 erythroide EPO-sensitive Vorläufer sind (Ozawa *et al.*, 1986).

Durch DNA-DotBlot-Analyse von Knochenmarkskulturen und Immunphänotypisierung von fötalen hämatopoetischen Zellen wurde gezeigt, daß nur proliferierende Zellen später Differenzierungsstadien (Pronormoblasten, Normoblasten) für eine effiziente B19-Replikation permissiv sind. Das Unvermögen in sehr frühen koloniebildenden Stadien zu replizieren, beruht möglicherweise auf einer erhöhten Empfindlichkeit dieser frühen primitiven Differenzierungsstadien gegen die NS1-vermittelte Cytotoxizität (Takahashi *et al.*, 1990; Morey & Fleming, 1992). Die Erythropoiese wird in B19-infizierten Zellkulturen supprimiert. Die nachfolgende Wiederentstehung erythroider Vorläuferzellen erklärt das transiente Auftreten B19-induzierter aplastischer Krisen im klinischen Bereich (Takahashi *et al.*, 1990). Die B19-Infektion induziert in den erythroiden Vorläufern apoptotische Veränderungen (Morey *et al.*, 1993; Moffatt *et al.*, 1998). Abgesehen von diesem auffälligen Tropismus für erythroide Vorläuferzellen kann eine B19-Infektion auch die Megakaryocytopoiese beeinträchtigen (Srivastava *et al.*, 1990).

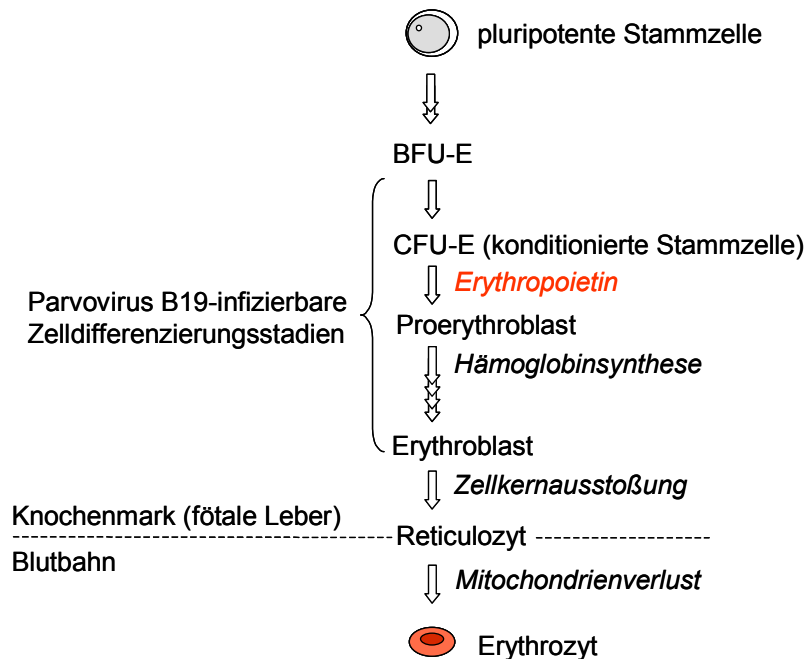


Abbildung 2: Erythroide Differenzierung von der Stammzelle zum reifen roten Blutkörperchen. BFU-E (burst forming unit-erythroid), CFU-E (colony forming unit-erythroid).

Bislang steht kein geeignetes Zellkultursystem zur effizienten Vermehrung des Virus zur Verfügung. Für eine produktive, virale Replikation sind nur Kulturen humaner Knochenmarkszellen (Ozawa *et al.*, 1986) und erythroide Zellen aus fötalen Leberzellen (Yaegashi *et al.*, 1989) oder peripherem Blut (Serke *et al.*, 1991) empfänglich. Die Replikation von Parvovirus B19 wurde auch in EPO-induzierten MB-02-Zellen (Megakaryocyten) gezeigt. Das virale Replikationslevel in MB-02-Zellen ist signifikant geringer als in Knochenmarkszellen (Munshi *et al.*, 1993). Alle diese Systeme sind aber durch die terminale Differenzierung erythroider Zielzellen und damit durch die Ausdünnung permissiver Zellen limitiert. In anderen etablierten, erythroleukämische Zelllinien, wie K562, konnte keine B19-Replikation nachgewiesen werden. Die kontinuierliche Propagierung von Parvovirus B19 konnte in der Erythropoietin-abhängigen megakaryoblastischen leukämischen Zelllinie UT-7 gezeigt werden. Die Abhängigkeit der viralen Replikation von der Adaptation dieser Zelllinie an Wachstum in Gegenwart von EPO läßt vermuten, daß die Permissivität von Zellen für Parvovirus B19 durch intrazelluläre Faktoren und weniger durch Oberflächenrezeptoren determiniert wird. Die virale Replikation in diesen Zellen war ebenfalls deutlich geringer als in Knochenmarkszellen (Shimomura *et al.*, 1992). Die vorgestellten Systeme sind nicht für die Gewinnung von Virus in präparativem Maßstab geeignet.

Die Assemblierung leerer, nichtinfektöser Viruspartikel wurde in CHO (*chinese hamster ovary*) - Zellen (Kajigaya *et al.*, 1989) und mit großer Ausbeute in Insektenzellen nach rekombinanter

Expression der Strukturproteine VP1 und VP2 gezeigt (Brown *et al.*, 1991; Kajigaya *et al.*, 1991). Das Hauptstrukturprotein VP2 ist für die Partikelassemblierung ausreichend, während VP1 allein nicht in der Lage ist, Kapside zu bilden. Die N-terminale Verkürzung von VP2 um 25 AS hat keinen Einfluß auf die Kapsidassemblierung (Kawase *et al.*, 1995).

## 1.4 Globosid - Zellulärer Rezeptor des Parvovirus B19?

Die durch rekombinante B19-Proteinkapside induzierte Hämagglutination (HA) humaner Erythrocyten konnte durch Membranextrakte aus Erythrocyten, Knochenmarks- und UT-7-Zellen inhibiert werden. Die Hämagglutination wurde zum Beispiel mit Extrakten aus K562 und HeLa-Zellen, die nicht für B19 permissiv sind, nicht gehemmt. Die HA-Aktivität konnte durch Behandlung der Erythrocyten mit Phospholipase A<sub>2</sub> unterbunden und mit hohen Konzentrationen Natriumperjodat verringert werden, als inhibierendes Agens wurde daher ein Glycolipid vermutet. Durch Globosid, einem Hauptglycosphingolipid an der Oberfläche von Erythrocyten, wurde die Parvovirus B19-vermittelten Hämagglutination stark inhibiert. Zusätzlich konnte die Bindung von B19-Kapsiden an immobilisiertes Globotetraosylceramid in Radioimmunassays gezeigt werden (Brown & Cohen, 1992; Brown *et al.*, 1993).

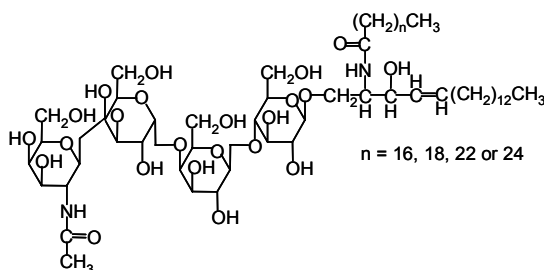


Abbildung 3: Strukturformel des Glycosphingolipids Globosid (Gb4Cer); GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ -Ceramid.

Der Zuckeranteil von Globosid ist eine Tetraose aus Glucose, zwei Galactosemolekülen und einem terminalen *N*-Acetyl-Galactosamin. Der Lipidanteil enthält nicht-hydroxylierte Fettsäuren aus 16 bis 24 Kohlenstoffatomen, die kovalent mit einem C<sub>18</sub>-Sphingosinrest verknüpft sind (Abbildung 3) (Naiki & Marcus, 1975). Globotetraosylceramid (Globosid) wurde mittels Hämagglutination-Inhibitionsassays als ein Antigen des 1927 von Landsteiner und Levine entdeckten P-Blutgruppensystem identifiziert (Naiki & Marcus, 1974).

Neben Globosid, dem Antigen P, werden die fünf Phänotypen des P-Blutgruppensystems von zwei weiteren neutralen Glycosphingolipiden, den Antigenen P<sup>K</sup> und P<sub>1</sub>, charakterisiert (Tabelle 1). Die Zuckerkomponente des Antigens P<sub>1</sub> hat die Struktur Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4GalNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc (Marcus *et al.*, 1981). Antigen P<sup>K</sup>, Globotriaosylceramid (Gb3Cer), unterscheidet sich von Globosid nur im Fehlen des terminalen *N*-Acetyl-Galactosamin. Erythrocyten der Phänotypen P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> enthalten zwar Gb3Cer, es ist aber nicht auf der Zelloberfläche exponiert. Charakte-

ristisch für Zellen des p-Phänotyps sind abnorme Mengen Lactosylceramid (Gal $\beta$ 4Glc-Ceramid), Paraglobosid (nLc4Cer, Gal $\beta$ 4GalNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc-Ceramid) und eine spezifische Gangliosid-Zusammensetzung mit einem erhöhten Anteil an Sialosylparaglobosid.

*Tabelle 1: Phänotypen des P-Blutgruppensystems und deren Häufigkeit (Bailly & Bouhours, 1995).*

Phänotyp	Häufigkeit	P <sup>K</sup> Gb3Cer	P Globosid	P <sub>1</sub>
P <sub>1</sub>	75 %	(•)	•	•
P <sub>2</sub>	25 %	(•)	•	-
P <sup>K</sup> <sub>1</sub>	sehr selten	•	-	•
P <sup>K</sup> <sub>2</sub>	sehr selten	•	-	-
p	sehr selten	-	-	-

Der Oligosaccharidanteil der Glycosphingolipide wird durch die sequentielle Übertragung von einzelnen Zuckerresten durch Glycosyltransferasen synthetisiert. Ausgehend von Lactosylceramid scheinen zwei Biosynthesewege zu existieren, einer zum Aufbau der P<sup>K</sup> und P-Antigene der Globo-Reihe und der andere zur Synthese des zur Neolacto-Gruppe der Glycolipide gehörenden P<sub>1</sub>-Antigens. Die Glycolipidzusammensetzung des p-Phänotyps wird als das Ergebnis einer metabolischen Blockade der Gb3Cer-Synthese interpretiert. Die Grundlage der Abwesenheit von P<sub>1</sub>-Antigen ist aber noch umstritten. Das Fehlen oder der sehr geringe Gehalt von Globosid auf Zellen des P<sup>K</sup>-Phänotyps scheint allerdings die Folge einer verminderten Aktivität der Glycosyltransferase zu sein, die die Gb4Cer-Synthese aus Globotriaosylceramid katalysiert. Zwischen den Phänotypen des P-Blutgruppensystems sind auch Unterschiede in der Kettenlänge des Lipidanteils zu beobachten. So enthalten p-Zellen erhöhte Mengen an C<sub>22</sub> - C<sub>24</sub> Fettsäuren, während in normalen Zellen die Kettenlängen C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> überwiegen (Bailly & Bouhours, 1995).

Parvovirus B19 hämagglutiniert normale humane Erythrocyten, nicht jedoch die vom p und P<sup>K</sup>-Phänotyp. Epidemiologische Studien in einer Amish-Population zeigten, daß Personen mit der seltenen Blutgruppe p gegen eine B19-Infektion resistent sind und keine Antikörper gegen das Parvovirus B19 entwickeln. In Knochenmarkszellen von p-Spendern konnte keine Virusreplikation nachgewiesen werden. Globosid und monoklonale Antikörper gegen Globosid schützen CFU-E vor der virusvermittelten Cytotoxizität. Globosid wurde daher als Rezeptor für Parvovirus B19 vorgeschlagen (Brown & Cohen, 1992; Brown *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1994).

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Parvovirus B19 VP2-Kapsiden allein oder im Komplex mit Globosid gelang mit einer Auflösung von 26 Å.

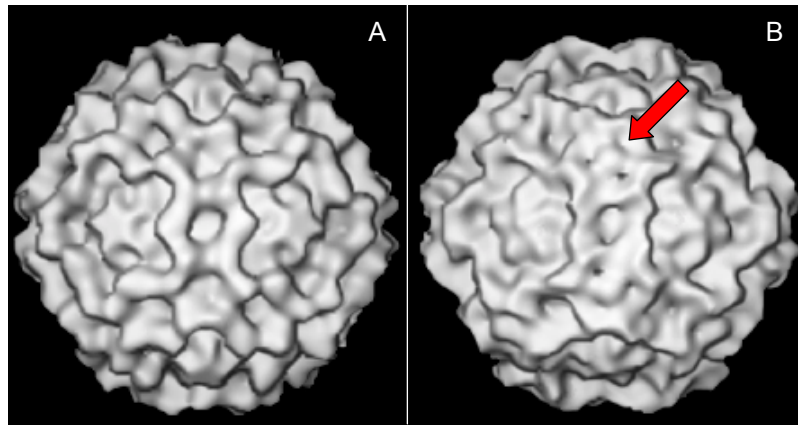


Abbildung 4: Bildrekonstruktion von Parvovirus B19-Partikeln aus der Cryo-EM-Elektronendichteverteilung (A) von leeren, rekombinanten VP2-Kapsiden und (B) VP2-Kapsiden komplexiert mit Globosid (Chipman *et al.*, 1996). Pfeil: zusätzliche Elektronendichte in der Vertiefung einer Dreifach-Symmetrieachse.

Die Unterschiede in der Elektronendichteverteilung von cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen leerer VP2-Proteinkapside mit und ohne Globosid lassen vermuten, daß der B19 / Globosidkontakt über die Bindung von Globotetraoseköpfen in einer trimeren helikalen Anordnung in die Vertiefungen an den Dreifach-Symmetrieachsen des Kapsids vermittelt wird. Nach computergestützter Anpassung eines Tetrasaccharids in die Elektronendichtedifferenzkarte wurde ein hydrophober Kontakt zu dem Tyrosinrest 401 von VP2 vorgeschlagen (Chipman *et al.*, 1996).

Die Interaktion mit Globosid erklärt nicht vollständig den ausgeprägten Zelltropismus von Parvovirus B19. Das P-Antigen Globosid ist nicht nur auf Erythrocyten und deren Vorläufern, sondern auch auf einer Vielzahl weiterer Zelltypen präsent, in denen das B19-Virus nicht repliziert. Globosid wurde auf der Oberfläche von Megakaryocyten, Endothelzellen, Fibroblasten, reifen und aktivierten B-Zellen, placentalen Trophoblasten, fötalen Leber- und Myocardzellen gefunden (dem Borne *et al.*, 1986; Wiels *et al.*, 1991; Cooling *et al.*, 1995; Jordan & DeLoia, 1999).

## 1.5 Virus-Rezeptor-Wechselwirkungen

Initialer Schritt der Infektion von Zellen durch verschiedene Pathogene ist die spezifische Erkennung von Oberflächendeterminanten der Zielzelle. Die molekularen Grundlagen der

Bindung sind unterschiedlicher Natur und können sehr komplex sein. Sekundäre Bindungsereignisse können erfolgen, wenn Änderungen des Liganden oder des Rezeptors während der Bindungsreaktion zu höherer Affinität führen oder weil zusätzliche Adhäsine und / oder Rezeptoren gebunden werden. Multivalente Interaktionen, die vor allem bei Kohlenhydrat-Protein-Kontakten beobachtet werden, erhöhen im allgemeinen die Avidität einer Wechselwirkung (Haywood, 1994; Norkin, 1995; Lee & Lee, 1995). Da die meisten Komponenten von Virus / Rezeptor-Systemen membranständige Proteine oder Lipide und zum Teil Bestandteil größerer Komplexe sind, lassen sich diese Systeme nur schwer mit biophysikalischen Methoden untersuchen. Zahlreiche Virusrezeptoren wurden bislang identifiziert. Einige Viren binden Proteine, andere Kohlenhydrate und manche beides (Haywood, 1994; Schneider-Schaulies, 2000). Hier nur einige Beispiele für vielfältige Virus / Rezeptor-Interaktionen:

Die Anlagerung des Influenzavirus (*Orthomyxoviridae*) an die Oberfläche bronchialer Epithelzellen geschieht durch Wechselwirkung zwischen Hämagglutinin, einem Lectin auf der Virusoberfläche, und mehreren Einheiten von *N*-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure), dem endständigen Zuckerrest vieler Glycoproteine an Zelloberflächen (Carroll *et al.*, 1981; Rogers *et al.*, 1983). Dieser Rezeptor / Protein-Komplex konnte auch röntgenkristallographisch beschrieben werden (Weis *et al.*, 1988). Das Vorhandensein der Sialinsäure scheint allerdings für die Infektion von Zellen durch Influenzavirus keine notwendige Voraussetzung zu sein (Stray *et al.*, 2000). Das *Bovine Parvovirus*, ein autonomes Parvovirus, das verschiedene Rinderzellen infiziert und humane Erythrocyten hämagglutinieren kann, interagiert ebenfalls mit *N*-Acetyl-Neuraminsäure, präsentiert durch Glycophorin A, dem Hauptglycoprotein der Erythrocytenmembran (Thacker & Johnson, 1998). Die Erkennung von Zuckerstrukturen wurde auch für andere Parvoviren beschrieben. So vermittelt membran-assoziiertes Heparansulfat-Proteoglycan die Anheftung von AAV-2-Virionen und die Infektion der Zielzellen (Summerford & Samulski, 1998). Die apikale Membran von Endothelzellen der Atmungsorgane enthält hochaffine Rezeptoren für das *Adeno-assoziierte Virus 5* (AAV-5). Erste Untersuchungen lassen vermuten, daß Sialinsäure auch hier der Rezeptor oder eine notwendige Komponente eines Rezeptorkomplexes ist (Walters *et al.*, 2001). Das *Canine Parvovirus* bindet sowohl an Sialinsäure als auch an Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine an der Oberfläche von empfänglichen feline T-Zellen (Barbis & Parrish, 1994). In A72 Zellen wurde mittels eines *virus overlay protein binding*-Assays und Immunpräzipitation ein spezifisches Bindemolekül für CPV identifiziert, ein 40- bis 42-kDa großes Glycoprotein (Basak *et al.*, 1994). Neueste Untersuchungen zeigen, daß CPV und FPV an humane und feline Transferrin-Rezeptoren binden und diese Proteine zum Eintritt in die Zelle nutzen (Parker *et al.*, 2001). Ein circa 67 kD großes Zelloberflächenprotein aus Leberzellen, das spezifisch *Aleutian Mink Disease Parvovirus* bindet, wurde noch nicht hinsichtlich der Glycosylierung charakterisiert (Fox & Bloom, 1999).



Die Bindung von  $\alpha$ -Herpesviren an Heparansulfat führt nicht notwendigerweise zum Zelleintritt. Mehrere Proteine wurden als Corezeptoren identifiziert (Spear *et al.*, 2000). Polyomaviren binden sialysierte Oligosaccharide an der Oberfläche empfänglicher Zellen. Einige Stämme erkennen zusätzlich verzweigte Oligosaccharide mit einem zweiten *N*-Acetyl-Neuraminsäure-Molekül. 1997 gelang die Aufklärung der Kristallstruktur eines rekombinanten Polyomavirus VP1-Pentamers im Komplex mit einem verzweigten disialysierten Hexasaccharid (Stehle & Harrison, 1997). Es scheint, daß die Bindung an Heparansulfat oder Sialinsäure die primäre, kinetisch schnelle Adhäsion der Viren an die Zielzelle ermöglicht und nachfolgend die Bindung eines weiteren höheraffinen Rezeptors oder Rezeptorkomplexes gewährleistet, der dann den Zelleintritt vermittelt (Schneider-Schaulies, 2000).

Die Bindung an glycosylierte Lipide ist für zahlreiche Wechselwirkungen von Bakterien mit ihren Wirtszellen beschrieben. Das mit den Blutgruppe P-Antigenen verwandte Glycosphingolipid, Sialosyl-Galactosylglobosid, ist ein Rezeptor für uropathogene *E.coli*-Stämme (Stroud *et al.*, 1998). Hämagglutination-Inhibitionstests mit Mono- und Oligosacchariden sowie Glycoproteinen indizieren, daß die für die *E.coli*-Bindung notwendige Minimalstruktur Gal $\alpha$ 4Gal in P-Blutgruppenantigenen auch von Galactose-bindenden Stämmen des Meningitisserregers *Streptococcus suis* erkannt wird. In Dünnschicht-Bindungsassays wurde gezeigt, daß *Streptococcus suis* an Globotriaosylceramid, aber nicht an Globosid oder Globopentaosylceramid bindet (Haataja *et al.*, 1993). Eine Glycolipiderkennung kann auch die Grundlage von Virus / Zellkontakten sein. Für die Bindung des Rötelnvirus (*Rubivirus*) an die Zelle spielen verschiedene Membranlipidkomponenten eine Rolle. Starke neutralisierende Eigenschaften zeigten verschiedene Phospholipide und Glycolipide, wie Ganglioside oder Lactosylceramid (Mastromarino *et al.*, 1990). Eine hochaffine Bindung von Influenzavirus an humane poly-Glycosylceramide wurde mittels eines Festphasenassays nachgewiesen (Matrosovich *et al.*, 1996). HIV-1 erkennt neben dem CD4-Glycoprotein und weiteren Corezeptoren auch Galactosyl- und Globotriaosylceramid (Fantini *et al.*, 1993; Puri *et al.*, 1999; Fantini *et al.*, 2000).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Verständnis der Interaktion von Pathogenen mit ihren Bindemolekülen an der Zielzelloberfläche ist eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung geeigneter Therapeutika. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von Parvovirus B19 mit seinen möglichen Rezeptor Globosid detailliert biophysikalisch und chemisch zu charakterisieren.

Nach Schaffung der notwendigen Voraussetzungen, wie Etablierung der rekombinanten Kapsidproduktion und Herstellung geeigneter Immunreagenzien, sollte durch Hämagglutinationsuntersuchungen das bindende Rezeptor-Oligomer identifiziert werden.

Mittels spektroskopischer und kalorimetrischer Untersuchungen sollte die Bindung an homogene und heterogene Kapside analysiert und Bindungsaffinitäten bestimmt werden. Die an der Bindung beteiligten molekularen Wechselwirkungen sollten im weiteren näher beschrieben werden. Ein Aspekt der Arbeit war dabei die Etablierung eines geeigneten Festphasen-Testsystems für die quantitative biophysikalische Untersuchung der Interaktion wasserlöslicher multivalenter Rezeptoranaloga mit rekombinanten Proteinkapsiden.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Biochemikalien

#### 2.1.1 Allgemeines

APPLICHEM, Darmstadt	DTT, IPTG, BSA Fraktion V
BIOMOL, Hamburg	CsCl, MOPS
DIFCO, Hamburg	Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt
GIBCOBRL LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe	FKS, Pluronic F68, T.C.100
MERCK, Darmstadt	Ampicillin, Borsäure, Bromphenolblau, CaCl <sub>2</sub> , Diethanolamin, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, GdCl, Glucose, Glycerin, Glycin, HEPES, Isopropanol, KAc, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MeOH, $\beta$ -Mercaptoethanol, MgCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NaAc, NaCl, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> Ac, NiCl <sub>2</sub> , NaN <sub>3</sub> , RbCl, Saccharose, Tween 20
NATIONAL DIAGNOSTICS, Atlanta, USA	Protogel-Acrylamidfertiglösung
PAN, Aidenbach	Kanamycin, RPMI1640/2 mM Gln
PERSEPTIVE BIOSYSTEMS, Warrington, U.K	DMF
ROCHE, Mannheim	NBT/BCIP-Stammlösung, Nonidet® P40
ROTH, Karlsruhe	AgNO <sub>3</sub> , EtOH, SDS
SIGMA, Taufkirchen	Aprotinin, L-Arginin, CHAPS, Cholesterin, DMSO, Gentamicin, Glutardialdehyd, Leupeptin, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Pepstatin A, L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin, PMSF, PNPP, Tetracyclin, Triton X-100, X-Gal
USB, Cleveland, USA	Tris

#### 2.1.2 Oligosaccharide und Glycolipide

Die Globotetraosederivate SN1, SN3 und SN4 (Abbildung 43) wurden freundlicherweise von Dr.Ulf Nilsson (Organic Chemistry 2, The Lund Institute of Technology, University of Lund, Schweden) zur Verfügung gestellt. Das Glykolipid Globosid und die Kontroll-Glykolipide wurden von SIGMA bezogen.

## 2.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Markierung	Quelle
<b>Primäre Antikörper:</b>				
860-55D	VP2-Kapsid	Mensch, mAκ, IgG	---	In der AG Modrow hergestellt
MC-631 (SSEA-3)	Galβ3GalNAcβ3 GalαR; kreuz-reaktiv gegen Globosid	Ratte, mAκ, IgM	---	Davor Solter, MPI, Freiburg
α-VP2	VP2	Kaninchen	---	Im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum
α-Parvovirus B19	VP1/VP2-Epitop	Maus, mAκ, IgG	---	CHEMICON, Temecula, USA
<b>Sekundäre Antikörper:</b>				
α-human-IgG	humanes IgG	Kaninchen	AP	DAKO, Glostrup, Dänemark
α-human-IgG/AP	humanes IgG	Ziege	AP	SIGMA, St.Louis, USA
α-rabbit-IgG/AP	Kaninchen-IgG	Schwein	AP	DAKO
α-rabbit-IgG/FITC	Kaninchen-IgG	Schwein	FITC	DAKO
α-mouse-IgG	Maus-IgG	Ziege	AP	BIORAD, Hercules, USA
α-rat-IgM	Ratten-IgM	Ziege	HRP	DIANOVA, Hamburg

## 2.1.4 Molekulargewichtsmarker

### DNA-Standards:

1 kb DNA ladder (NEB, Beverly, USA)	0,5 – 10 kb
100 bp DNA ladder (NEB)	100 – 1500 bp
DNA Molecular Weight Marker VI (ROCHE)	150 – 2100 bp
DNA Molecular Weight Marker VII (ROCHE)	81 – 8570 bp

*Protein-Standards:*

Prestained Precision Protein Standard, Broad range (BIORAD, Hercules, USA)	10 – 250 kD
LMW, Dalton Marker VII-L (SIGMA, Taufkirchen)	14,2 – 66 kD
HMW, High Molecular weight marker (SIGMA)	24 – 205 kD
[ <sup>14</sup> C] Methylierter Proteinstandard CFA 626 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH Europe, Freiburg)	14,3 – 220 kD
Molecular Weight Marker Kit for Nondenaturing PAGE (SIGMA)	14 – 500 kD

**2.2 Puffer und Nährmedien****PBS-Puffer**

Zur Herstellung der PBS-Gebrauchslösung wurden 500 ml Stammlösung A in einen 5 l-Kolben mit ~ 4 l H<sub>2</sub>O verdünnt und 500 ml Stammlösung B zugegeben. Nach Einstellen der Lösung auf pH 7,0 – 7,4 wurde auf 5 l aufgefüllt. PBS (ohne) enthält kein Calcium- und Magnesiumchlorid.

<i>[10x] Stammlösung A:</i>	1,37	M	NaCl
	26,8	mM	KCl
	80,0	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	14,7	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<i>[10x] Stammlösung B:</i>	9,0	mM	CaCl <sub>2</sub>
	4,9	mM	MgCl <sub>2</sub>

**TE-Puffer**

<i>TE für DNA-Proben:</i>	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA

**LB (Luria-Bertani)-Medium**

<i>Zusammensetzung:</i>	1,0	%	Bacto-Trypton
	0,5	%	Bacto-Hefeextrakt
	1,0	%	NaCl

Nach dem Lösen der Substanzen in H<sub>2</sub>O wurde der pH auf 7,5 eingestellt und das Medium durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % Agar (DIFCO) zugefügt. Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Zusatz geeigneter Antibiotika, z.B. Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml.

## SOC-Medium, pH 7,0

Zusammensetzung:	2,0	%	Bacto-Trypton
	0,5	%	Bacto-Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	MgSO <sub>4</sub>
	20	mM	Glucose

Die Herstellung erfolgte wie in (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben.

## 2.3 Organismen

### *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 3: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	NOVAGEN, Madison, USA
DH5α	F <sup>-</sup> $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1, hsdRI7(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	GIBCOBRL
DH10Bac™ competent cells	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>rpsL nupG</i> /bMON14272 /pMON7124	GIBCOBRL
ER2566	F <sup>-</sup> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> Δ( <i>mcrC-mrr</i> )114::IS10R( <i>mcr-73::miniTn10—tetS</i> )2 R( <i>zgb-210::Tn10</i> ) (TetS) <i>endA1 [dcm]</i>	NEB, Schwalbach
SG13009[pREP4]	Nal <sup>S</sup> Str <sup>S</sup> <i>rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal mtl</i> F <sup>-</sup> <i>recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup></i>	QIAGEN, Hilden
SURE®	e14 <sup>-</sup> ( <i>McrA</i> )Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan <sup>r</sup> ) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup></i> ΔM15Tn10(Tet <sup>r</sup> )]	STRATAGENE, La Jolla, USA

### Eukaryotische Zelllinien:

Die *Insektenzelllinie Sf9* (ATCC CRL-1711) (INVITROGEN, Groningen, Niederlande) basiert auf *Spodoptera frugiperda* Ovarzellen und wurde zur Herstellung und Vermehrung rekombinanter Baculoviren und zur Überexpression von Fremdgenen genutzt.

Die *Megakaryocyten-Zelllinie MB-02* wurde erstmals 1991 von Doris Morgan beschrieben (Morgan *et al.*, 1991). Diese humane, leukämische Zelllinie kann durch Erythropoietin zur erythroiden Differenzierung und damit zu für Parvovirus B19 permissiven Differenzierungsstadien (Munshi *et al.*, 1993) stimuliert werden.

Die *erythroleukämische Zelllinie K562* (ATCC CCL-243) wurde aus einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) in der Blastenkrise etabliert (Lozzio & Lozzio, 1975). Die Zellpopulation ist weitgehend undifferenziert und gehört zur Granulocytenlinie. Die K562-Blasten sind multipotente, hämatopoetisch maligne Zellen, die spontan zu Vorläufern von Erythrocyten, Granulocyten und Monocyten differenzieren (Lozzio *et al.*, 1981).

Die verwendete *HeLa S3-Zelllinie* (ATCC CCL-2.2) ist ein an das Wachstum in Suspensionskultur adaptierter Klon der ursprünglichen, aus einem humanen Cervix-Karzinom etablierten HeLa-Zelllinie (Puck *et al.*, 1956).

### Virusstämme:

Baculovirus AcMNPV-VP2 wurde unserer Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Motz (MIKROGEN GMBH, München) überlassen. Alle weiteren verwendeten rekombinanten Baculoviren (Tabelle 4) wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt.

*Tabelle 4: In dieser Arbeit hergestellte rekombinante Baculoviren*

Bezeichnung	Bac-to Bac-Donorplasmid	Eigenschaften
Bac-duVP12	pfbdual-VP12	VP1 unter p10-Promoter, VP2 unter <i>polh</i> Promoter
Bac-duVP12-mut1	pfbdual-VP12-mut1	wie Bac-duVP12 + Mutation 1 im <i>polh</i> Promoter
Bac-duVP12-mut2	pfbdual-VP12-mut2	wie Bac-duVP12 + Mutation 2 im <i>p10</i> Promoter
Bac-duVP12-mut12	pfbdual-VP12-mut12	wie Bac-duVP12 + Mutationen 1 und 2

## 2.4 Plasmide und Oligonukleotide

Sämtliche Primer und Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, gereinigt und entsalzt von der Firma METABION (Planegg-Martinsried) bezogen.

## 2.4.1 B19-Sequenzierprimer

Tabelle 5: Überblick über die für Kontrollsequenzierungen verwendeten Primer

Bezeichnung	T <sub>m</sub> (°C)	DNA-Sequenz (5'-3')	Anmerkung
3B1	52	AGTTTTGTCTGTAACATCC	Position auf Standardisolat pYT103: 3511-3529
3F1	50	ATGACTTTAGGTATAGCC	pYT103-Position: 2901-2918
4B1	52	ACAATTCTTCAGGCTTTTC	pYT103-Position: 4739-4757
4B2	52	GTGGTGTGTTTTGCATC	pYT103-Position: 4709-4726
4F1	50	AATGTACAATCCCTTATAC	pYT103-Position: 3877-3895
4F2	50	ATGAAGACCATGCAATTC	pYT103-Position: 3957-3974
7B2	48	CAAACCTTCCTTGAAAATG	pYT103-Position: 3065-3082
8B2	50	AGGATATTCTAGTGTTTTG	pYT103-Position: 4088-4106
8F1	52	CAATGCCAGTGGAAGG	pYT103-Position: 3319-3335
8F2	52	CCCCATGGAGATATTTAG	pYT103-Position: 3378-3395
9F2	50	AAGAGCCCTTCACTATG	pYT103-Position: 4375-4391
duprom_b	54	CTCGAGATCCCGGGTG	backward im pfbdual-Promoterbereich
duprom_f	52	CTAGATTCGAAAGCGGC	forward im pfbdual-Promoterbereich
pET-intein	70	ACCCATGACCTTATTACCAACCTC	backward im Inteinbereich
QE-prom	54	CCCGAAAAGTGCCACCTG	forward im pQE40-Promoterbereich
T7-prom	56	TAATACGACTCACTATAGGG	forward im T7-Promoterbereich
T7-term	58	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	backward im T7-Terminatorbereich
T7-universal	66	CGGGGATCTCGATCCCGCG	forward im T7-Promoterbereich



## 2.4.2 PCR-Primer und Oligonukleotide

Tabelle 6: Übersicht zu verwendeten PCR-Primern und Oligos (xxx = Template-Sequenz, XXX = inserierte Sequenz, XxX = Schnittstelle, XxX = spezielles Codon, XxX = Start-bzw. Stopcodon)

Bezeichnung	T <sub>m</sub> (°C)	DNA-Sequenz (5'-3')	Anmerkung
du-VP1_1	66	TTATAACTCGAGAAatgagtaaagaaa gtggcaaattgg	Insertion einer XhoI-Stelle am 5'-Ende von VP1
du-VP1_2	62	TTATAAGCTAGCttacaatgggtgcac acggc	Insertion einer NheI-Stelle am 3'-Ende von VP1
du-VP2_1	62	TATCTAGAatgacttcagttaattctg c	Insertion einer XbaI-Stelle am 5'-Ende von VP2
du-VP2_2	62	TTATAAAAGCttacaatgggtgcacac ggc	Insertion einer HindIII-Stelle am 3'-Ende von VP2
mut1_C	66/98	tgcgCCAAGCTTGGcattttaattatc tccatg	forward zur Insertion der Mutation 1 (HindIII-Stelle) im pfbdual-Promoterbereich
mut1_D	62/94	tgCCAAGCTTGGcgcaaataaataagt attttactg	backward zur Insertion der Mutation 1 (HindIII-Stelle) im pfbdual-Promoterbereich
mut2_E	64/74	gttTGGtaagaattattatcaaatcat ttg	forward zur Insertion der Mutation 2 im pfbdual- Promoterbereich
mut2_G	78/88	gatttgataataattcttaCCAaacta taatatattg	backward zur Insertion der Mutation 2 im pfbdual- Promoterbereich
mut_A	74	ctgtagtgctgtcagtaacctgtac	forward für Mutation des pfbdual-Promoterbereiches
mut_B	68	ctgcaccttttaaagtaaagtagtc	backward für Mutation des pfbdual-Promoterbereiches
QE_AscI/1		GATCCAATCGATTGGCGCGCCGAAGT GAGCGGCCGCTATCATTCGAGTG GTCACCTGGTAC	5'-3' bzw. 3'-5' Oligonukleotid zum annealing eines BamHI/KpnI-kompatiblen dsDNA-Fragmentes mit einer AscI-Stelle (MWG Biotech, Ebersberg)
QE_AscI/2		CAGTGACCACTCGAATGATAGCGGCCG CTCCAGTTCGGCGCGCCAATCGATTG	
QE-VP2_1	58	ATTAGGCGCGCCgcatgacttcagtta attctg	Insertion einer AscI-Stelle am 5'-Ende von VP2
QE-VP2_2	60	ctgagggcaCCCCggggag	Insertion einer SmaI-Stelle am 3'-Ende von VP2

Bezeichnung	T <sub>m</sub> (°C)	DNA-Sequenz (5'-3')	Anmerkung
TYB-VP1	62	TTATAAATTAATatgagtaaagaaagt ggcaaatg	Insertion einer AseI-Stelle am 5'-Ende von VP1
TYB-VP2_1	60	TTATAAATTAATatgacttcagttaat tctgcag	Insertion einer AseI-Stelle am 5'-Ende von VP2
TYB-VP2_2	58	AATAAGGCTCTTCCGCacaatgggtgc acacggct	Insertion einer SapI-Stelle am 3'-Ende von VP2
TYB-VP2gly	58	AATAAGGCTCTTCCGCAACCaatggg tgcacacggct	Insertion einer SapI-Stelle und eines Glycin-Codon am 3'-Ende von VP2

## 2.4.3 Plasmide

Tabelle 7: Ausgangsvektoren

Bezeichnung	Größe (bp)	Bemerkungen	Quelle
pcVP1 (pcDNA3-VP1)		Klonierungsvektor, PCR-Template	AG Modrow (A. Hemauer)
pET11a	5677	Expressionsvektor, IPTG-Induktion	NOVAGEN
pFastBac Dual (pfbdual)	5238	Donorplasmid für das Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem	GIBCOBRL
pQE40	4032	Expressionsvektor, [6xHis] am N-Terminus, IPTG-Induktion	QIAGEN
pTYB1	7280	Expressionsvektor, Intein am C-Terminus, IPTG-Induktion	NEB, Schwalbach
pUC18-VP1		Klonierungsvektor, PCR-Template	AG Modrow (G. Kiourkenides)

Tabelle 8: In dieser Arbeit konstruierte Vektoren

Bezeichnung	Ausgangs- vektor	Insertion	verwendete Schnittstellen	Größe (bp)
pET11a-VP1	pET11a	VP1-Gen	NheI, NdeI/AseI	8023
pET11a-VP2	pET11a	VP2-Gen		7342
pfbdual-VP12	pfbdual-VP2	+ VP1-Gen	XhoI, NheI	9227

Bezeichnung	Ausgangs-vektor	Insertion	verwendete Schnittstellen	Größe (bp)
pfbdual-VP12mut1	pfbdual-VP12	+ Mutation 1 im <i>polh</i> Promoterbereich	PCR-Mutagenese, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I	9227
pfbdual-VP12mut2	pfbdual-VP12	+ Mutation 2 im <i>p10</i> Promoterbereich		
pfbdual-VP12mut12	pfbdual-VP12	+ Mutationen 1 und 2 im Promoterbereich		
pfbdual-VP2	pFastBac Dual	VP2-Gen	<i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III	6886
pTYB1-hiv	pTYB1	1500 bp-nonsense	<i>Eco</i> RI, <i>Xho</i> I	8937
pTYB1-VP2	pTYB1-hiv	VP2 über 3-Fragment-Klonierung	<i>Nde</i> I/ <i>Ascl</i> , <i>Bse</i> RI, <i>Sap</i> I	8894
pTYB1-VP2gly	pTYB1-hiv	VP2+Gly am C-Terminus über 3-Fragment-Klonierung		8897
pQE40- <i>Ascl</i>	pQE40	DNA-Fragment mit <i>Ascl</i> -Schnittstelle	<i>Bam</i> HI, <i>Kpn</i> I	3501
pQE40-VP2	pQE40- <i>Ascl</i>	VP2-Gen	<i>Ascl</i> , <i>Sma</i> I	5134

## 2.5 Zentrifugen

*Kühlzentrifuge MR22i mit Rotor AM2.19* (JOUAN GMBH, Unterhaching)

*Rotixa/RP mit Rotordurchmesser 169 mm* (HETTICH ZENTRIFUGEN, Tuttlingen)

*Sorvall® RC 5B Plus mit SS-34, SUPER LITE™ GSA SLA-1500 oder GS-3 SLA-3000* (KENDRO, Newtown, USA)

*Tischzentrifuge Biofuge 15 mit Rotor #3754* (HERAEUS SEPATECH; KENDRO, Newtown, USA)

*Tischzentrifuge Centrifuge 5415C* (EPPENDORF, Hamburg)

*Ultrazentrifuge Centrikon T-2170* (KONTRON INSTRUMENTS, Neufahrn) *mit Ausschwingrotor SW40Ti* (BECKMAN COULTER, Fullerton, USA)

## 2.6 Datenanalyse

Datenanalyse, -management und -darstellung erfolgte mit Hilfe von Personalcomputern unter den Betriebssystemen Windows 98 und Windows 2000 (MICROSOFT) und mit Internetzugang mit folgenden Programmen:

Adobe®Photoshop 5.0, Chromas 1.45 (McCarthy, Griffith University, Southport, Australien), Clone Manager 4.1 (SCIENTIFIC&EDUCATIONAL SOFTWARE), DNA STAR (EditSeq 3.97, SeqMan 3.57), Wisconsin Package Version 10.0 (GENETICS COMPUTER GROUP, GCG, Madison, USA), Gene Runner 3.00 (HASTINGS SOFTWARE), MICROSOFT Excel, MICROSOFT Powerpoint, MICROSOFT Word, RefMan 9.5 (RESEARCH INFORMATION SYSTEMS), SigmaPlot 5.0 (SPSS), WinSPIRS™2.0 (SilverPlatter International). Am Phospho-Imager, Gamma-Counter und Densitometer wurden die gerätespezifischen Programme genutzt.

## 3 Methoden

### 3.1 Bakterien

#### 3.1.1 Kultivierung und Erhaltung von Bakterien

Die Anzucht von *E.coli*-Stämmen erfolgte unter Schütteln bei 37°C in LB-Medium, dem gegebenenfalls geeignete Antibiotika zugesetzt wurden. Die Vereinzelung der Kulturen erfolgte auf LB-Agar-Platten. Zur längeren Lagerung wurden frische Bakterienkolonien unter Verwendung von Microbank™Kryoröhrchen (MAST DIAGNOSTICA, Reinfeld) bei –70°C aufbewahrt.

#### 3.1.2 Bakterientransformation

##### 3.1.2.1 Chemische Transformation von *E.coli*

**Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*:** Eine frische *E.coli* Übernacht-Kultur wurde 1:100 in 50 ml SOC-Medium verdünnt und nach Kultivierung bei 37°C unter Schütteln bei einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,5 geerntet. Die Zellen wurden 10 min bei 4000 rpm und 4°C pelletiert und in 16 ml kaltem TP1 resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wurde in 4 ml TP2 aufgenommen und die Zellen in 200 µl-Aliquots eingefroren (flüssiger N<sub>2</sub> → -70°C).

Transformationspuffer TP1, pH 5,8:	0,1	M	RbCl
	50	mM	MnCl <sub>2</sub>
	30	mM	KAc
	10,2	mM	CaCl <sub>2</sub>
	11,5	%	Glycerin

Transformationspuffer TP2, pH 6,8:	0,1	M	RbCl
	10	mM	MOPS
	75	mM	CaCl <sub>2</sub>
	11,5	%	Glycerin

**Chemische Transformation:** 200 µl chemisch-kompetenter Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz oder 1 µg Plasmid-DNA vermischt und 30 bis 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigem Hitzeschock bei 42°C (Thermoblock; LIEBSCH, Bielefeld) wurde die Suspension kurz auf Eis gestellt und 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugeben. Die Zellen wurden 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> bis 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.1.2.2 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

**Herstellung elektrokompetenter *E.coli* nach (Dower et al., 1988):** Alle Schritte der Präparation wurden soweit wie möglich bei 0°C durchgeführt. Ein Liter LB-Medium wurde mit 1/100 vol einer frischen *E.coli* Übernacht-Kultur inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Zur Ernte wurde die *E.coli*-Kultur 15 bis 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei maximal 4000xg und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde entfernt und das verbleibende Pellet vorsichtig in 1 l eiskaltem Wasser resuspendiert, ohne die Zellen zu lysieren. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Zellsediment in 0,5 l eiskaltem Wasser gewaschen und in ~ 20 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin (v/v in H<sub>2</sub>O) aufgenommen. Die Zellen wurden nochmals pelletiert, in eiskaltem 10 %-igem Glycerin zu einer Dichte von ~ 1 – 3 x 10<sup>10</sup> Zellen/ml aufgenommen, in Aliquots mit flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -70°C gelagert.

**Elektroporation:** 40 µl elektro-kompetenter Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl DNA in H<sub>2</sub>O (oder TE) vermischt und 30 bis 60 sec auf Eis inkubiert. Die Zellen/DNA-Mischung wurde in eine auf Eis vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (2 mm) transferiert und mit einem Stromstoß (25 µF, 200 Ω, 2,25 kV) mit einer Zeitkonstante zwischen 4 und 5 msec behandelt (Gene Pulser™ System; BIORAD, Hercules, USA). Die Zellen wurden schnell in 1 ml vorgewärmten (37°C) SOC-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert, für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert.

## 3.2 Eukaryotische Zelllinien

*Brutschrank B6120 und BB6220CU* (HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau)  
*Falcon Tissue culture flasks, 0,2 µm vented blue plug seal cap* (BECTON-DICKINSON, Franklin Lakes, USA) und *6-well Zellkulturplatten* (GREINER LABORTECHNIK, Frickenhausen)

### 3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

#### HeLa S3 und K562

HeLa S3- und K562-Zellen wurden als Suspensionskultur bei einer optimalen Zelldichte von 1 x 10<sup>5</sup> – 1 x 10<sup>6</sup> / ml gehalten. Dem Medium RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin wurden 10 % Fötale Kälberserum zugesetzt. Vor der Zugabe zum Kultivierungsmedium wurde das FKS 3 h bei 56°C zur Komplementinaktivierung inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung und 90 % Luftfeuchtigkeit.

## MB-02

MB-02-Zellen wurden als Suspensionskultur bei einer optimalen Zelldichte von  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  / ml gehalten. Dem Fertigmedium RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin wurden 10 % Humanserum und 3 ng/ml rhuGM-CSF (*recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor*; R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA) zugesetzt. Vor der Zugabe zum Kultivierungsmedium wurde das Humanserum 30 min bei 56°C zur Komplementinaktivierung inkubiert und durch eine Membran (45 µm Porengröße) filtriert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung und 90 % Luftfeuchtigkeit.

Zur Induktion der erythroiden Differenzierung wurden die Zellen einer logarithmisch wachsenden MB-02-Kultur 7 min bei 275xg zentrifugiert, einmal mit RPMI 1640 ohne Humanserum gewaschen und zu einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$ /ml in Differenzierungsmedium aufgenommen. Zur Herstellung des Differenzierungsmediums wurden dem Fertigmedium RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin 10 % Humanserum, 10 U/ml Erythropoietin (NeoRecormon 1000; ROCHE) und 10 ng/ml SCF (*stem cell factor*; R&D SYSTEMS) zugesetzt.

## Sf9-Insektenzellen

Zur Sf9-Kultivierung wurden dem Fertigmedium T.C.100 10 % inaktiviertes FKS und 0,1 mg/ml Kanamycin zugesetzt. Für die Kultivierung in Spinnerflaschen (*Micro carrier spinner flasks*; DUNN LABORTECHNIK, Asbach) wurde dieses Medium mit 0,2 % Pluronic F69 ergänzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 27°C und gegebenenfalls bei einer Rührgeschwindigkeit von 50 – 70 rpm (Variomag Elektronicrührer Biosystems B und Biomodul 40B; H+P LABORTECHNIK, München). Die Sf9-Insektenzellen wurden in Spinnerkultur bei einer optimalen Zelldichte von  $0,4 \times 10^6$  –  $2 \times 10^6$  / ml gehalten.

Für die dauerhafte Lagerung wurden  $2 - 3 \times 10^7$  Zellen einer logarithmisch wachsenden Suspensionskultur (> 98 % lebende Zellen) 10 min bei 120xg abzentrifugiert, in 1,5 ml Gefriermedium (50 % T.C.100, 40 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen und auf Eis in ein eiskaltes Microgefäß eingefüllt. Die Zellen wurden schrittweise eingefroren (1 h 20°C; 24 h 70°C) und in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert.

### 3.2.2 Einführung von Fremd-DNA in Sf9-Zellen

#### 3.2.2.1 Transfektion von Sf9-Zellen mit rekombinanter Bacmid-DNA

Die Arbeiten zur Transfektion von Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA folgten weitgehend den Vorschriften zum Bac-to-Bac®Baculovirus Expressionssystem (GIBCOBRL). Als Medium wurde T.C.100 mit oder ohne Kanamycin bzw. FKS verwendet.

#### 3.2.2.2 Baculovirus/Sf9-Expressionssystem

**Infektion von Sf9-Zellen:**  $6 - 7 \times 10^7$  Zellen einer frischen logarithmischen Sf9-Kultur wurden in einer Zellkulturflasche mit 175 cm<sup>2</sup> Bodenfläche ausgesät und 30 min zur Adsorption der Zellen am Flaschenboden stehengelassen. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit Baculoviren infiziert (MOI~2,5 in 5 ml T.C.100 + Kanamycin). Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 27°C wurden 15 ml Kultivierungsmedium zugegeben und die Zellen bei 27°C kultiviert. 2½ Tage nach Virusinokulation wurden die Zellen aus zwei 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen vereinigt und 10 min bei 430xg abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal in PBS-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Zur Propagierung der Baculoviren wurden die Zellen 5 d nach Virusinokulation geerntet, 10 min bei 1170xg abzentrifugiert und der Virustiter im Überstand (Baculostock) mittels Plaque Assay bestimmt.

**Plaque Assay zur Virustiterbestimmung:** Zur Bestimmung des Baculovirentiters wurden  $2,5 \times 10^6$  Sf9-Zellen aus einer Spinnerkultur pro Vertiefung einer 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und 30 min bei 37°C adsorbiert.

Nach dem Absaugen des Mediums wurde je Loch 1 ml verdünnte Virussuspension (Verdünnungsstufen des Baculostocks:  $10^4 - 10^9$ ) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Virusverdünnung erfolgte in T.C.100-Medium ohne FKS mit Kanamycin und 1 µl Dextran-Stamm-lösung/ml. Der Virusüberstand wurde abgesaugt, 2,5 ml 1,5 % Softagar pro Loch vorsichtig auf die Zellschicht aufgebracht und die Kulturen bei 27°C inkubiert. Nach 3 d Inkubation wurde eine weitere Softagarschicht mit Neutralrot zur Anfärbung lebender Zellen aufgetragen (1,5 ml 0,9 % Softagar pro Loch) und die Platten 3 – 5 Tage bis zur Entstehung zählbarer (weißer) Plaques bei 27°C weiterinkubiert. Aus den gezählten Plaques wurde unter Einbeziehung der Verdünnungsstufe der Virustiter des Virusstocks bestimmt.

1,5 % Softagar:	4	vol	[2 x] T.C.100 + Kanamycin + Dextran
	1	vol	FKS
	5	vol	3 % LMP Agarose (w/v in H <sub>2</sub> O; FMC BIOPRODUCTS, Rockland, USA)



0,9% Softagar:	4	vol	[2 x] T.C.100 + Kanamycin
	1	vol	FKS
	5	vol	1,8 % LMP-Agarose
	0,01	%	Neutralrot (SIGMA)
Dextran-Stammlösung:	5	%	w/v in H <sub>2</sub> O (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
Neutralrot-Stammlösung:	0,2	%	in 18,25 % EtOH

### 3.2.3 Zellzählung in der Neubauer-Kammer

Die zu zählende Zellsuspension wurde 1:1 mit 0,1 % Trypanblau (MERCK, Darmstadt) zur Anfärbung toter Zellen versetzt und in die Zählkammer (BRAND) eingefüllt. Nach Auszählen von mindestens 4 von 9 16er-Felder unter dem Mikroskop (Lichtmikroskop Wilovert S; HUND, Wetzlar) wurde die durchschnittliche Zellzahl pro 16er-Feld bestimmt und daraus die Zellzahl der Ausgangssuspension nach folgender Formel errechnet:

$$16\text{er Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

## 3.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

*Peltier Thermal Cycler PTC-200* (MJ RESEARCH, Waltham, USA)  
*Thermocycler 9600* (PERKIN ELMER, Weiterstadt)

#### 3.3.1.1 Pwo-Polymerase

Für Klonierungs-PCR wurde die *Pwo*-Polymerase (5 U/μl; ROCHE) aus dem hyperthermophilen Bakterium *Pyrococcus woesei* verwendet, die eine Korrekturleseaktivität besitzt.

Sämtliche PCR-Amplifikationen wurden, wenn nicht anders angegeben, in unten angegebener Zusammensetzung (Tabelle 9), gegebenenfalls unter Veränderung der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration (Tabelle 10) nach unten aufgeführtem Temperaturprogramm (Tabelle 11) durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten variierten in Abhängigkeit von Primersequenz bzw. gewünschter PCR-Fragmentlänge (Tabelle 12).

[12,5 x] dNTP mix: je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP (ROCHE)

Tabelle 9: Standardzusammensetzung der PCR-Ansätze

Komponente	V = 100 µl	V = 50 µl	Endkonzentration (e.c.)
master mix 1:			
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ad 25 µl	
[12,5 x] dNTP-mix	8 µl	4 µl	je 200 µM
5 µM forward primer	5 µl		250 nM (100 µl), 500 nM (50 µl)
5 µM backward primer	5 µl		250 nM (100 µl), 500 nM (50 µl)
Template-DNA	x µl		0,1 – 0,75 µg
master mix 2:			
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ad 25 µl	
[10 x] PCR-Puffer mit 20 mM MgSO <sub>4</sub>	10 µl	5 µl	10 mM Tris/HCl, pH 8,85; 25 mM KCl; 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 2 mM MgSO <sub>4</sub>
<i>Pwo</i> -Polymerase	0,5 µl		2,5 U

Tabelle 10 : Mg<sup>2+</sup>-Titration in 100 µl-PCR-Ansatz (Optimum 1 – 10 mM):

25 mM MgSO <sub>4</sub> (µl)	6	8	10	12	14	16
e.c. [mM]	1,5	2	2,5	3	3,5	4

Tabelle 11: Standard-Temperaturprogramm

<b>initiale Denaturierung</b>	1 x	2 min	94°C
<b>Denaturierung</b>	34 x	30 sec	94°C
<b>Annealing</b>		30 sec	45-65°C (T <sub>m</sub> – 5°C, Tabelle 6: )
<b>Elongation</b>		Tabelle 12	72°C
<b>finale Elongation</b>	1 x	4 min	72°C

Tabelle 12: Elongationszeiten in Abhängigkeit von der Fragmentlänge

<b>Elongationszeit</b>	45 sec	1 min	2 min
<b>PCR-Fragmentlänge</b>	bis 1 kb	1,5 kb	3 kb

### 3.3.1.2 Overlap Extension PCR Mutagenesis

Spezifischer Mutationen in DNA-Sequenzen wurden mittels PCR-Mutagenese unter Verwendung der *Pwo*-Polymerase eingeführt. Das Prinzip der PCR-Mutagenese mit überlappenden Enden (Ho *et al.*, 1989) ist in Abbildung 5 dargestellt.

Grundsätzlich sollte beim Design der Primer folgende Kriterien beachtet werden. Alle verwendeten Primer sollten mehr als 16 bp lang sein, einen niedrigen A/T-Gehalt und keine Sekundärstrukturen aufweisen. Die Distanz zwischen den Primern A und B sollte weniger als 2000 Nukleotide betragen. Zwischen den äußeren Primern und der Mutationsstelle muß jeweils eine singuläre Schnittstelle liegen, die den spezifischen Austausch des mutierten DNA-Fragmentes in die Template-Sequenz ermöglicht. Die Mutageneseprimer D und C sollten mit mehr als 16 bp komplementär überlappen. Zwischen der mutierten Sequenz und dem 3'-Ende des Primers sollten mehr als 16 bp liegen.

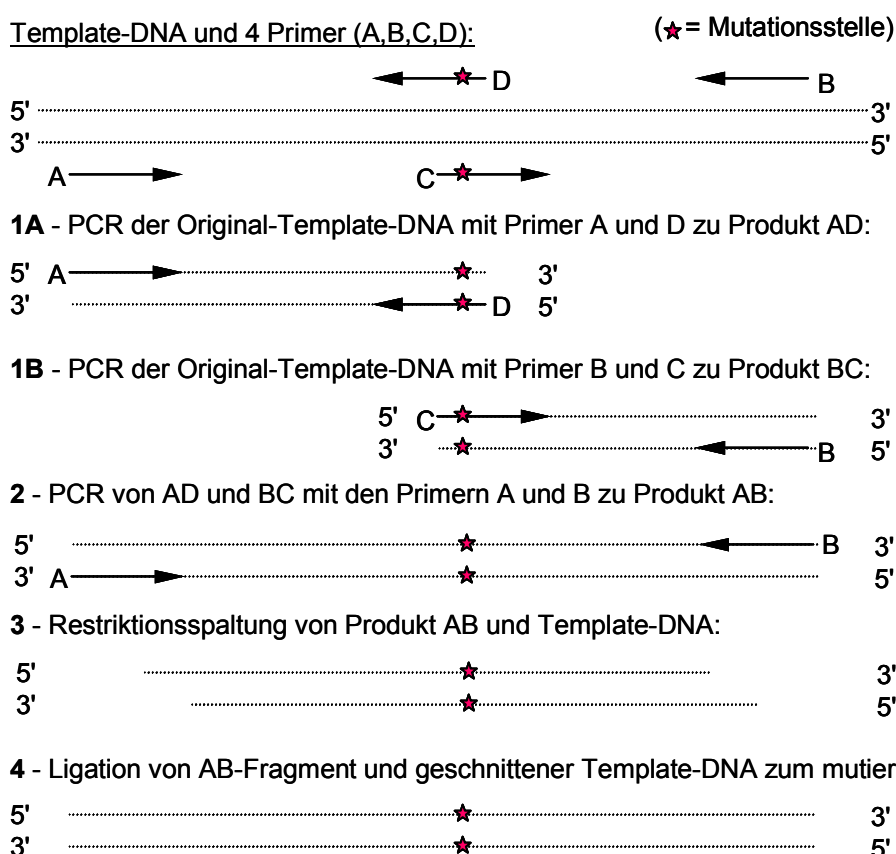


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Overlap Extension PCR-Mutagenese

### 3.3.1.3 QIAquick PCR-Fragmentreinigung

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) entsprechend den Firmenangaben oder über Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Gel.

### 3.3.2 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Molekülen mittels horizontaler Gelelektrophorese wurde die Agarosegeldichte in TAE (pH 8,0; 40 mM Tris; 0,1 % HAc; 0,2 mM EDTA) oder TBE-Puffer (pH 8,0; 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 0,5 mM EDTA) entsprechend den zu trennenden DNA-Molekülgrößen (Tabelle 13) gewählt.

*Tabelle 13: Agarosedichte in Abhängigkeit von der zu trennenden DNA-Molekülgröße*

% Agarose	0,7	1,0	1,5	2,0
DNA-Fragmentlänge (kb)	10 – 0,8	5 – 0,4	3 – 0,2	1,5 – 0,1

Der Agarose wurde zur DNA-Visualisierung Ethidiumbromid (APPLICHEM) mit einer Endkonzentration von 70 ng/ml zugesetzt. Zum Auftragen wurde die DNA mit DNA-Auftragspuffer versetzt.

[5 x] DNA-Auftragspuffer:      0,125 %    Bromphenolblau  
   0,125 %    Xylencyanol (MERCK)  
   25 %      Glycerin

Die DNA-Banden wurden unter UV (312 nm) detektiert und dokumentiert. Bei der präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Banden bei 365 nm visualisiert, aus dem Gel herausgeschnitten und extrahiert (3.3.3.3).

*Elektrophoresekammer* (H.HÖLZEL, Dorfen)

*Minielektrophoresekammer* (ELEKTROWERKSTATT, Universität Regensburg)

*UV-Durchlichtschirm 312 nm* (BACHOFER LABORATORIUMSGERÄTE, Reutlingen) und *UV-Schirm*

*UVT-14L 365 nm* (HEROLAB LABORGERÄTE, Wiesloch)

*Videodokumentationssystem Gelprint 2000i* (MWG BIOTECH, Ebersberg)

### 3.3.3 DNA-Reinigung

#### 3.3.3.1 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus frischen *E.coli*-Übernachtskulturen mit kommerziell erhältlichen Plasmidpräparationskits der Firmen BIO RAD (Quantum Prep®) bzw. MACHEREY & NAGEL (Nucleobond AX; Düren) entsprechend den beigefügten Instruktionen.

### 3.3.3.2 DNA-Extraktion

**Isopropanolfällung:** Die DNA-Probe wurde mit 1 vol 4 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  und 2 vol Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation (14000 rpm, Tischzentrifuge) wurde das DNA-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE oder  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

**Ethanolfällung:** Die DNA-Probe wurde mit 1/10 vol 3 M NaAc, pH 4,8 und 2,5 vol EtOH versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation (14000 rpm, Tischzentrifuge) wurde das DNA-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE oder  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

### 3.3.3.3 DNA-Gelextraktion

Die Extraktion von DNA-Stücken aus Agarosegelen erfolgte mittels kommerziell erhältlicher DNA-Extraktionskits der Firmen QIAGEN (QIAEX II), ENERGENE (NuClean II; Regensburg) oder BIO101 (GeneClean II; Vista, USA) nach Vorschrift.

## 3.3.4 dsDNA-Konzentrationsbestimmung

$$E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 0,05 = [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

*Zweistrahl-Absorptionsspektrophotometer UVIKON 930 (KONTRON INSTRUMENTS)*  
*Quartzküvetten (HELLMA)*

## 3.3.5 Restriktion und Ligation von Plasmid-DNA

### 3.3.5.1 DNA-Restriktion

Plasmide und gereinigte PCR-Produkte wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in einem Standardansatz (Sambrook *et al.*, 1989) 1 - 2 h bei 37°C gespalten.

### 3.3.5.2 5'-Dephosphorylierung

Zur Vermeidung von Religanden wurden Vektor-DNA-Fragmente vor der Ligation mit Alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase; NEB) dephosphoryliert. Dazu wurde zweimal 10 U Enzym zum Restriktionsansatz pipettiert und jeweils 15 min bei 37°C inkubiert.

### 3.3.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Gereinigte Vektor- und Insert-DNA wurde je nach Fragmentgrößen in einem molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:10 in 10 µl Ligationsansatz eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989) und 1 – 2 h bei RT bzw. ÜN bei 16°C mit 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl; NEB bzw. 5 U/µl; ROCHE) inkubiert.

### 3.3.5.4 Hybridisierung von synthetischen Oligonukleotiden

Synthetische, komplementäre Oligonukleotide wurden in einem Verhältnis 1:1 (jeweils 300 ng) in einem Gesamtvolumen von 20 µl 10 min bei 95°C aufgeschmolzen und langsam auf RT abgekühlt. Die Enden der Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, daß der resultierende DNA-Doppelstrang definierte 3'- und 5'-Überhänge erhielt, die kompatibel zu den gewünschten Restriktionsstellen waren.

## 3.3.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung erfolgte durch Angestellte des Institutes für medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universität Regensburg) nach der Sanger-Kettenabbruchmethode mit Hilfe des BigDye Terminator DNA Sequencing Kits und eines ABI Prism 377 DNA Sequencers (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt) bei einer Standard-Primerkonzentration von 1 µM.

## 3.4 Herstellung rekombinanter Baculoviren

### 3.4.1.1 Transposition von Bacmid-DNA und Blau/Weiß-Screening

Die Arbeiten zur Transposition der Bacmid-DNA folgten weitgehend den offiziellen Vorschriften zum Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem (GIBCOBRL). Es wurden LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin (SIGMA), 7 µg/ml Gentamicin und 10 µg/ml Tetracyclin hergestellt und frisch je 100 µl X-Gal-Stammlösung (25 mg/ml DMF) und IPTG-Stammlösung (10 mg/ml H<sub>2</sub>O) ausplattiert. 50 µl kompetenter DH10Bac-*E.coli* wurden mit circa 5 ng rekombinanter Donorplasmid-DNA chemisch transformiert, auf dem oben beschriebenen Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

### 3.4.1.2 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA

Die Isolation der rekombinanten Bacmid-DNA aus DH10Bac-*E.coli* erfolgte entsprechend den Versuchsvorschriften des Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystems (GIBCOBRL). Zur Transfektion von Sf9-Insektenzellen mit rekombinanter Bacmid-DNA siehe 3.2.2.1.

## 3.5 Proteinchemische Methoden

### 3.5.1 Produktion und Reinigung von rekombinanten Proteinen

#### 3.5.1.1 Induktion der Proteinexpression in *E.coli*

Zur Fremdproteinexpression wurde eine logarithmisch wachsende *E.coli*-Kultur bei einer OD<sub>580</sub> von 0,5 – 0,7 mit 1 – 2 mM IPTG induziert und die Zellen 3 – 5 h nach Induktion geerntet.

#### 3.5.1.2 Reinigung von [6xHis]-Protein unter denaturierenden Bedingungen

1 l einer induzierten *E.coli*-Kultur wurde 4 h nach Induktion geerntet und nach Aufnahme in 25 ml FP-Puffer (pH 8,0; 100 mM Na-P-P, 10 mM Tris/HCl) in der French Press aufgeschlossen. Das Zellysat wurde 40 min bei 19000 rpm (SS35, SORVALL) bei 4°C zentrifugiert, das Pellet in 20 ml FP-Urea (FP-Puffer + 8 M Harnstoff) aufgenommen und 3 x 30 sec auf Eis mit Ultraschall behandelt. Die Probe wurde nochmals 10 min zentrifugiert und der Überstand auf eine Ni<sup>2+</sup>-Ionenaustausch-Affinitätschromatographiesäule (Chelating Sepharose®Fast Flow Chromatographiegel; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH EUROPE, Freiburg) aufgetragen. Nach Erreichen der Basislinie durch Waschen mit FP-Urea wurde das [6xHis]-Protein mit einem Imidazolgradienten (0 bis 0,3 M) in FP-Urea eluiert. Die Proteinfraction wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm und SDS-PAGE bestimmt, aufkonzentriert und mittels PrepCell (3.5.2.5) weitergereinigt.

#### 3.5.1.3 Inclusion body-Reinigung

Zur Reinigung über Inclusionbodies wurde 1 l einer entsprechenden rekombinanten *E.coli*-Kultur nach 4 h Induktion geerntet und mit Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA) gewaschen. Nach Aufschluß mittels French Press (40K-Zelle; SLM AMINCO) in 30 ml Aufschlußpuffer wurden 7,5 ml [5 x] Membransolubilisierungspuffer zugegeben und die Probe 30 min bei RT unter Rühren inkubiert. Das Zellysat wurde anschließend 1 h bei 25000xg, 4°C zentrifugiert und das Pellet 3 - 4 x mit [1 x] Membransolubilisierungspuffer gewaschen. Das gereinigte IB-Pellet wurde in Aufschlußpuffer bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

[5 x] Membransolubilisierungspuffer:	250	mM	Tris/HCl; pH 8,0
	10	mM	EDTA
	10	%	(v/v) Triton X-100
	2,5	M	NaCl

### 3.5.1.4 Membranproteinanreicherung

Zur Anreicherung der Membranproteine aus humanen Zelllinien wurden  $0,7 \times 10^9$  Zellen 10 min bei 275xg, 4°C pelletiert und zweimal mit Aufschlußpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 60 ml Aufschlußpuffer resuspendiert, mittels mehrfachem (vier- bis fünfmal) Einfrieren und Auftauen bei -20°C aufgeschlossen und 5 min bei 1700xg, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 30 min bei 75000xg, 4°C zentrifugiert und das verbleibende Pellet in 2 ml Aufschlußpuffer aufgenommen. Nach Proteinbestimmung wurde die Probe in Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -70°C gelagert.

*Aufschlußpuffer:*

PBS (ohne) mit Proteaseinhibitoren		
1	M	PMSF
5	µg/ml	Leupeptin
0,02	TIU/ml	Aprotinin
1	µg/ml	Pepstatin A

### 3.5.1.5 Kapsidpräparation

#### 3.5.1.5.1 CsCl-Kissen und CsCl-Dichtegradient

Zur Kapsidpräparation wurden  $\sim 4 \times 10^8$  Zellen (entspricht 3 Pellets, siehe 3.2.2.2) in 5 ml Lysispuffer resuspendiert, mittels mehrfachem Einfrieren und Auftauen bei -20°C (3 x) aufgeschlossen und 15 min bei 2000xg, 10°C zentrifugiert.

**Sedimentation in ein CsCl-Kissen:** In einem 14 ml-Zentrifugenröhrchen (KENDRO, Osterode) wurden 2 ml CsCl-Lösung A (46 %, w/w;  $\zeta = 1,52 \text{ g/cm}^3$  in TE-TX) mit 2,5 ml CsCl-Lösung B (24 %, w/w;  $\zeta = 1,22 \text{ g/cm}^3$  in TE-TX) und 6 ml Lysatüberstand vorsichtig überschichtet. Die Probe wurde 4 h bei 150000xg, 10°C ultrazentrifugiert und die opake Proteinbande im CsCl-Gradienten durch Anstechen des Zentrifugationsröhrchens von der Seite abgenommen.

**Kontinuierlicher CsCl-Gradient:** Die erhaltenen 0,5 – 1 ml Kapsidfraktion wurden mit 9 ml CsCl-Lösung C (32 %, w/w;  $\zeta = 1,31 \text{ g/cm}^3$  in TE) gemischt und der Gradient bis zur Gleichgewichtseinstellung 20 h bei 150000xg, 10°C zentrifugiert. Die opake Proteinbande im oberen Drittel des Gradienten wurde wiederum von der Seite abgenommen. Die Kapsidfraktion ( $\sim 1 \text{ ml}$ ) wurde gegen PBS dialysiert und der Proteingehalt der denaturierten Probe (3.5.4.2) determiniert. Die Dichte der CsCl-Fractionen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt (Abbé-Refraktometer R6000G; LEO KUEBLER, Karlsruhe).

*Lysispuffer:*

10	mM	Tris/HCl ; pH 7,4
10	mM	NaCl
15	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5	%	Triton X-100
40	µl/ml	Complete-Stammlösung



<i>TE-TX-Puffer:</i>	50	mM	Tris/HCl ; pH 8,7
	25	mM	EDTA
	0,5	%	Triton X-100
<i>TE-Puffer:</i>	50	mM	Tris/HCl ; pH 8,7
	25	mM	EDTA
<i>Complete-Stammlösung</i>	1 Tablette / 2 ml H <sub>2</sub> O		<i>Complete</i> protease inhibitor cocktail tablets (ROCHE, Mannheim)

### 3.5.1.5.2 Saccharose-Dichtegradient

Zur Auftrennung der im CsCl-Gradienten gewonnenen Kapsidfraktion wurden 200 – 500 µl der gegen PBS dialysierten Probe auf einen Saccharose-Stufengradienten (10 – 25 % in PBS, w/v; l = 8,5 cm, 16 Stufen á 0,6 ml) aufgetragen und die Probe 2 h bei 150000xg, 10°C zentrifugiert. Die Proteinfractionen wurden durch langsames Austropfen vom Boden des Zentrifugationsröhrchens gewonnen und mittels SDS-Gelelektrophorese charakterisiert.

### 3.5.1.6 Dialyse von Proteinlösungen

Zur Dialyse wurden kommerziell erhältliche Dialysekammern der Firma PIERCE (Slide-A-Lyzer; Rockford, USA) entsprechend den Verwendungsinstruktionen oder herkömmliche Dialysesläuche benutzt. Die Dialysesläuche wurden vor Verwendung 10 min in 2 % NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA pH 8,0 gekocht und anschließend mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen.

### 3.5.1.7 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Das Aufkonzentrieren von Proteinproben erfolgte mit Centrisart®-Röhrchen (SARTORIUS, Göttingen) oder Centrikon Mikrokonzentratoren (AMICON) nach Anleitung des Herstellers.

Gegen PBS dialysierte Kapsidfraktionen wurden gegebenenfalls über einem 70 %-igen Saccharosekissen (w/w in PBS) durch Zentrifugation für 3 h bei 150000xg (SW40Ti) angereichert.

## 3.5.2 Protein-Gelelektrophorese

### 3.5.2.1 Analytische SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel (5 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 7,0; 0,1 % (w/v) SDS)

konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche Trenngel (7,5–15 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,5; 0,1 % SDS) ein. Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele sind der Beschreibung der Gerätehersteller zu entnehmen. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100°C denaturiert. Bei nichtreduzierender SDS-PAGE enthält der Probenpuffer kein  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) bei 2,5 - 3 mA/cm Gellänge.

[5 x] Probenpuffer:	312,5	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	5	%	SDS
	25	%	$\beta$ -Mercaptoethanol
	25	%	Glycerin
	2,5	mM	EDTA
	1 Spatelspitze		Bromphenolblau

*Minigel-Twin Slabgel System* (BIOMETRA, Göttingen)

*Hoefer SE600 Vertical-Elektrophoreseapparatur* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg)

### 3.5.2.2 Native diskontinuierliche Gelelektrophorese

Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen ermöglicht die Separierung der Proteine nach ihren „nativen“ Charakteristika, wie Größe, Form und Ladung. Die Probenproteine wurden zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel (5 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8) konzentriert und dann im Trenngel (7,5–15 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8) aufgetrennt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer (pH 8,3; 5 mM Tris, 38,4 mM Glycin) bei 1 – 1,5 mA/cm Gellänge.

[2 x] Probenpuffer:	1	ml	[3 x] Trispuffer
	1	ml	87 % Glycerin
	1	ml	H <sub>2</sub> O
	0,25	mg	Bromphenolblau

[3 x] Trispuffer:	500	mM	Tris/HCl, pH 6,7
	0,46	$\mu$ l/100 ml	TEMED

### 3.5.2.3 2D-Elektrophorese mit immobilisiertem pH-Gradienten

Die zwei-dimensionale Elektrophorese (O'Farrell, 1975) mit immobilisiertem pH-Gradienten (Görg *et al.*, 1985) ermöglicht die reproduzierbare Auftrennung komplexer Proteingemische unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse. Die sehr hohe Auflösung gegenüber eindimensionalen Elektrophoresemethoden wird erreicht, da die Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien, dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht, getrennt werden. Der Aufbau der Apparaturen und die Durchführung erfolgte weitgehend nach den Angaben des Herstellers.

**Erste Dimension / Isoelektrische Fokussierung (IEF):** Bei der hier verwendeten Methode wird die IEF nicht in mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten (O'Farrell, 1975), sondern mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) durchgeführt. Der immobilisierte pH-Gradient ist fester Bestandteil des Gels und entsteht durch Kopolymerisation von Immobilen<sup>®</sup> (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit Acrylamidmonomeren. Der pH-Gradient ist zeitstabil, da er kovalent an die Matrix gebunden ist. Basischen Proteine > pH 7,5, die bei Trägerampholyt-Fokussierungen aufgrund der Kathodendrift verloren gehen, bleiben daher erhalten. Die auf Folie polymerisierten Flachgele werden in Abhängigkeit von den Eigenschaften der zu analysierenden Proteine mit den passenden Additiven rehydratisiert. Das Probenmaterial (Membranproteinfractionen aus 3.5.1.4) wurde 15 min bei RT mit DNase I behandelt, in 5 ml PBS (mit *complete* Proteaseinhibitoren, 40 µl Stammlösung/ml) aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 75000xg, 4°C). Das verbleibende Pellet wurde in Lysispuffer zu einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml aufgenommen und 330 µl dieser Proteinlösung auf einen IPG-Streifen (ReadyStrip, pH Bereich 3 – 10, 17 cm Länge; BIORAD) appliziert. Die Fokussierung erfolgte nach den unten angegebenen Parametern. Nach der Fokussierung wurden die Einzelstreifen bis zur weiteren Verwendung bei –80°C in einer Klarsichthülle gelagert.

**Lysispuffer:**

9	M	Harnstoff
1	%	DTT
2	%	CHAPS
0,8	%	Bio-Lyte, pH 3 - 10 (BIORAD)
5	mM	Pefabloc

Die Lösung wurde portioniert bei –80°C gelagert.

**Complete-Stammlösung**

1 Tablette /  
2 ml H<sub>2</sub>O

*Complete* protease inhibitor cocktail  
tablets (ROCHE)

**Fokussierbedingungen:**  
(Protean<sup>®</sup> IEF Cell, BIORAD)

Temperatur	20°C	
Stromstärke	0,05 mA / Streifen	
Rehydratisierung	30 – 50 V	12 h
	200 V	1 h
	500 V	1 h
	500 – 10000 V	1 h
	10000 V	3 h

**Zweite Dimension / SDS-PAGE:** Für die SDS-PAGE wurde das homogen vernetzte SDS-Gel (18 x 20 cm; 10 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS) mit dem Puffersystem nach Laemmli ohne Sammelgel hergestellt. Die Gießkassette wurde nicht vollständig mit der Gel-lösung gefüllt, sondern 1 cm kürzer gegossen, damit der IPG-Streifen aufgelegt werden kann. Die IPG-Streifen wurden zur Äquilibration 2x10 min in 2x10 ml Äquilibration-lösung (50 mM Tris/HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 2 % SDS; etwas Bromphenolblau) geschüttelt, nach kurzem Abspülen mit Elektrodenpuffer (pH 8,3; 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) luftblasenfrei auf das vertikale SDS-Gel gelegt und mit heißer Agarose (0,5 % w/v in Elektrodenpuffer) fixiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das SDS-Gel in die Elektrophorese-

apparatur (Protean®II xi 2-D Cell, BIO RAD) eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Um einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten, wurde die Stromstärke für 1 h auf 16 mA Gellänge begrenzt. Die Trennung bei 24 mA pro Gel wurde beendet, wenn sich die Bromphenolblaufront circa 1 cm vor Ende des Trenngels befand.

### 3.5.2.4 Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Zur Aufbewahrung wurden die SDS-Gele mit Hilfe des DryEase™ Gel Drying Systems (NOVEX, San Diego, USA) oder im Geltrockner für ~ 3 h bei 70°C unter Vakuum getrocknet.

### 3.5.2.5 Präparative SDS-PAGE: PrepCell

Mit der präparativen Elektrophoreseapparatur können Proteine aus komplexen Gemischen kontinuierlich elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert werden. Der Aufbau der verwendeten Gelapparatur (Prep Cell Model 491; BIO RAD) und das Gießen der Gele erfolgte nach Angaben des Geräteherstellers. Zur präparativen Auftrennung wurde die Proteinprobe mit [5x] Probenpuffer (siehe 3.5.2.1.) versetzt und 3 ml Probe auf das Sammelgel (1,5 cm Gellänge; 4 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl, pH 7,0; 0,1 % (w/v) SDS) aufgetragen. Die Proteine wurden im Trenngel (5 cm Gellänge; 7,5–15 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl, pH 8,5; 0,1 % SDS) separiert und das Eluat in 3 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden durch Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und analytische SDS-PAGE näher charakterisiert.

<i>[10 x] Laufpuffer:</i>	250	mM	Tris/HCl, pH 8,3
	1	%	SDS
	2	M	Glycin

<i>Laufbedingungen:</i>	Stromstärke	40 mA (konstant)
	Elutionsflußrate	0,3 ml/min

## 3.5.3 Proteinfärbung

### 3.5.3.1 Coomassiefärbung

Die Sensitivität der Coomassiefärbung reicht bis 0,1 µg Protein pro Gelbande. Zur Färbung wurde das SDS-Gel 30 min in Färbelösung und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung inkubiert.

<i>Färbelösung:</i>	45	% (v/v)	MeOH
	10	% (v/v)	HAc
	0,25	% (w/v)	Brilliant Blue R 250 (SIGMA)

<i>Entfärbelösung:</i>	30	% (v/v)	MeOH
	10	% (v/v)	HAc

### 3.5.3.2 Silberfärbung

Mit der Silberfärbung können 0,1 – 1 ng Protein pro Bande im Gel nachgewiesen werden. Das SDS-Gel wurde zunächst 1 h bei RT fixiert und dann 1 bis 12 h in Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimal 10 min Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde das Gel 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt, kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen und das Gel bis zur gewünschten Färbung entwickelt. Die Färbereaktion wurde durch 10 min Inkubation in Abbrechtlösung gestoppt.

<i>Fixierlösung:</i>	30	%	EtOH
	15	%	HAc
<i>Inkubationslösung:</i>	0,5	M	NaAc
	8	mM	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Natriumthiosulfat)
	25	%	EtOH
	0,125	%	Glutardialdehyd
<i>Färbelösung:</i>	6	mM	AgNO <sub>3</sub>
	0,01	%	Formaldehyd
<i>Entwicklerlösung, pH 11,5:</i>	235	mM	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,01	%	Formaldehyd
<i>Abbrechtlösung:</i>	0,05	%	EDTA

## 3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 3.5.4.1 Bradford-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einer Fertiglösung der Firma BIO RAD (Proteinassay-Farbstoffkonzentrat). Im Testansatz wurden 800 µl Proteinlösung und 200 µl Färbelösung gemischt und nach 5 – 60 min Inkubation die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand einer BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der Proteinprobe ermittelt.

### 3.5.4.2 Photometrische Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch Bestimmung der Extinktion bei 280 nm ermittelt.

**Rekombinante Kapside:** Zur Proteinquantifizierung in Kapsidfraktionen wurde die gegen PBS dialysierte Probe 1:5 in 8 M GdCl verdünnt und dann die Extinktion des denaturierten Proteins bei 280 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  von  $87350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  wurde unter Verwen-

dung des GCG-Sequenzauswerteprogramms aus der Proteinsequenz ermittelt (Gill & von Hippel, 1989).

*Zweistrahl-Absorptionsspektrophotometer UVIKON 930 (KONTRON INSTRUMENTS)*  
*Quartzküvetten (HELLMA)*

### 3.5.4.3 Densitometrische Proteinbestimmung

Zur densitometrischen Quantifizierung von AP-gefärbten Proteinbanden auf Nitrocellulose-Membranen wurde die Remission bei einer Wellenlänge von 546 nm und mit einer Schlitzblende von 2 x 0,2 mm oder einer 0,2 mm-Lochblende gemessen. Die Membranen wurden mit Schrittweiten von 0,502 mm in horizontaler und 0,047 mm in vertikaler Richtung (entgegen der Laufrichtung der Auftrennung) abgetastet. Für die Auswertung wurde jeweils über die Gelspur gemittelt.

*Densitometer Elscript 400 AT mit geräteeigener Auswerte-Software (HIRSCHMANN, Neuried)*

## 3.5.5 WesternBlot-Analyse

### 3.5.5.1 Proteintransfer und Immunreaktion

**Proteintransfer auf immobilisierende Membranen:** Zur Vorbereitung wurden die Nitrocellulosemembran (Protean®BA85, 0,45 µm; SCHLEICHER&SCHÜLL, Keene, USA) und das Filterpapier (Gel-Blotting-Papier GB004; SCHLEICHER&SCHÜLL) mit Transferpuffer (24,8 mM Tris; 200 mM Glycin; 20 % MeOH) angefeuchtet. Nach Aufbau der Blotting-Apparatur entsprechend den Herstellerangaben wurden die Proteine 30 - 40 min mit 3 - 5 mA/cm<sup>2</sup> aus dem Proteingel auf die immobilisierende Membran transferiert. Der Transfer wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau-Rot (0,1 % Ponceau S Red, 5 % Essigsäure) überprüft und die Membran nach Kennzeichnung des Molekulargewichtsmarkers in TTBS entfärbt.

*Fastblot B34 Blotting Apparatur (BIOMETRA, Göttingen)*  
*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRAD)*

**Bindung der Antikörper:** Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden für 1 h bei RT mit 5 % Magermilchlösung abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 1 h mit einer 1:500- bis 1:2000-Verdünnung des spezifischen primären Antikörpers in TBS inkubiert. Nach dreimal 5 min Waschen in TTBS erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:2000-Verdünnung in TBS). Anschließend wurde die Membran wieder dreimal 5 min mit TTBS gewaschen und die Farbreaktion entsprechend dem sekundären Antikörper (AP- oder HRP-gekoppelt) durchgeführt.

<i>TTBS:</i>	160	mM	NaCl
	20	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,01	% (v/v)	Tween 20
<i>Magermilchlösung:</i>	5	% (w/v)	Magermilchpulver
	0,5	% (v/v)	Tween 20
	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150	mM	NaCl
	(0,1	% (w/v)	NaN <sub>3</sub> )

### 3.5.5.2 Alkalische Phosphatase

Zur Proteindetektion über eine AP/Substrat-vermittelte Farbreaktion wurde die Membran mit Färbepuffer bedeckt und im Dunklen bis zur gewünschten Färbung inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz in H<sub>2</sub>O gespült und getrocknet.

<i>Färbepuffer:</i>	100	mM	Tris/HCl, pH 9,5
	50	mM	MgCl <sub>2</sub>
	100	mM	NaCl
<i>frisch zugeben:</i>	0,38	mg/ml	NBT (4-Nitro blue-tetrazoliumchlorid)
	0,19	mg/ml	BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)

### 3.5.5.3 Peroxidase: Diaminobenzidin-Färbung

Zur Proteindetektion über eine HRP/Substrat-vermittelte Farbreaktion wurde die Membran für 1 – 5 min in Färbelösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit verdünnter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt, die Membran mit H<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet.

<i>Färbelösung:</i>	50	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,5	%	NiCl <sub>2</sub>
	0,02	%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	1 Spatelspitze		3,3'Diaminobenzidin

## 3.5.6 Proteinde- und renaturierung zum *in vitro*-Kapsidassembly

### 3.5.6.1 Denaturierungsmittel

Die Konzentration der Denaturierungsmittel in der Stammlösung wurde mittels Refraktometer (ZEISS OPTRON) und folgenden Formeln (Pace, 1986) bestimmt:

*Harnstoff:*  $117,66 \times \Delta n + 29,753 \times (\Delta n)^2 + 185,56 \times (\Delta n)^3 = [M]$

*Guanidin:*  $57,147 \times \Delta n + 38,68 \times (\Delta n)^2 - 91,6 \times (\Delta n)^3 = [M]$

$\Delta n$ : Differenz der Brechungsindices zwischen Puffer mit und ohne Denaturierungsmittel

### 3.5.6.2 Renaturierung

Vor Renaturierung wurden die *Inclusion Body*-Proteine (3.5.1.3) in Proteinsolubilisierungspuffer mit 6 M GdCl aufgenommen und 2 h bei RT gerührt. Zur Renaturierung wurde das Denaturierungsmittel GdCl durch sequentielle Dialyse gegen oder Verdünnung in Renaturierungspuffer (Tabelle 19) aus der Proteinprobe entfernt.

<i>Proteinsolubilisierungspuffer:</i>	0,1	M	Tris/HCl, pH 8,5
	2	mM	EDTA
	0,1 - 0,3	M	DTE
	0 - 6	M	GdCl

### 3.5.7 Gelfiltration zur Renaturierungskontrolle

Die Gelfiltration erfolgte über eine Superdex 200HR 10/30-Säule (PHARMACIA, Uppsala, Schweden) mit 24 ml Säulenvolumen, angeschlossen an eine Kontron HPLC Anlage, bei einer Flußrate von 0,5 ml/min in Elutionspuffer. Es wurden 2 – 4 µg „renaturiertes Protein“ in 20 µl Probenvolumen aufgetragen (Elutionspuffer A). Als Vergleichsprobe wurden 0,8 – 4 µg im Baculo/Sf9-System produzierte VP2-Kapside in 20 µl Probenvolumen eingesetzt (Elutionspuffer B). Die Detektion der Proteinfraktion erfolgte über die Bestimmung der OD<sub>280</sub>.

<i>Elutionspuffer A:</i>	0,1	M	Tris/HCl, pH 7,5
	0,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,9	mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,5	M	L-Arginin
	0,5	mM	DTE

<i>Elutionspuffer B:</i>	0,1	M	Tris/HCl, pH 7,5
	200	mM	NaCl
	0,5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,9	mM	CaCl <sub>2</sub>

### 3.5.8 Produktion von Kaninchen-Antiserum

#### 3.5.8.1 Immunisierung von Kaninchen

Vor Immunisierung wurde den Tieren (Chinchilla-Bastard-Kaninchen, CHB; CHARLES RIVER, Sulzfeld) zu Kontrollzwecken 1 ml Blut zur Präserumgewinnung abgenommen. Zur Primärimmunisierung wurde eine Emulsion aus 200 µg (164 µl) VP2-Protein und 200 µl TiterMax<sup>®</sup> Adjuvants (CYTRx, Norcross, USA) durch mehrfaches Passagieren der Protein /Adjuvants-Suspension durch eine Mikrokanüle hergestellt und je 100 µg Protein intramuskulär und subkutan (4 – 5 Depots) injiziert. Vier Wochen danach erfolgte die Abnahme von 1 ml Immuneserum zur Kontrolle und die boost-Immunisierung mit gleichen Proteinmengen. Drei Wochen später wurden die Tiere ausgeblutet und das Serum gewonnen. Dazu wurde die Blutprobe zur Agglu-



tination mindestens 2 h bei 6°C gelagert, 20 min bei 760xg zentrifugiert und der Serumüberstand vorsichtig abgenommen. Die Serumreaktivität wurde im ELISA (siehe 3.5.9.2) oder mittels recomBlot Parvovirus B19 IgG/IgM-Teststreifen (MIKROGEN) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Serumproben wurden bei -70°C oder mit 0,02 %  $\text{NaN}_3$  versetzt im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.5.8.2 IgG-Anreicherung aus Serum

Die Anreicherung der IgG-Fraktion aus Serumproben erfolgte mit Hilfe von Protein G-Sepharose Säulen (HiTrap, 5 ml; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Das Säulenmaterial wurde mit Startpuffer (20 mM Na-P-P, pH 7,0) äquilibriert. Die Serumprobe wurde 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert, anschließend 1:4 in Startpuffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 10 vol Startpuffer wurde die IgG-Proteinfraktion mit 0,1 M Glycin/HCl-Puffer (pH 2,7) eluiert. In den Fraktionsröhrchen wurde zur pH-Neutralisation 100 µl 1 M Tris/HCl (pH 9,5) pro ml Elutionsvolumen vorgelegt. Die IgG-Fraktion wurde mittels  $\text{OD}_{280}$ -Bestimmung und SDS-Gelelektrophorese lokalisiert, gegen PBS dialysiert und mit 0,02 %  $\text{NaN}_3$  versetzt bei 4°C gelagert.

## 3.5.9 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

*Photometer Spectra Classic II* (SLT-TECAN, Crailsheim)

### 3.5.9.1 Direkter Kapsid-ELISA

Eine Immunolon®4-Platte (DYNATECH, Chantilly, USA) wurde mit 100 µl Kapsidlösung (1 – 2 µg/ml in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5) pro Loch ÜN bei 4°C beschichtet. Die Kapsidlösung wurde entfernt und die Platte mit 3 % BSA in PBS für 1 h bei RT abgesättigt. Nach viermaligem Waschen mit 0,2 % BSA in PBS erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (100 µl 860-55D, 1:1000 in 0,2 % BSA) für 1 h bei RT. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,2 % BSA wurde der sekundäre Antikörper (100 µl  $\alpha$ -human-IgG/AP, 1:2000 in 0,2 % BSA) für 45 min zugegeben und anschließend viermal mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Analyse der durch Alkalische Phosphatase vermittelten Farbreaktion.

### 3.5.9.2 ELISA zur Bestimmung der Serumreaktivität

Für die Bestimmung der Serumreaktivität wurden 244 ng rekombinantes [6xHis]-VP2-Protein pro Loch einer Immunolon®4-ELISA-Platte (DYNATECH) ÜN bei 4°C beschichtet und freie Bindungsstellen für 1 h bei RT mit 2 % BSA in PBS abgesättigt. Pro Loch wurden 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen der zu testenden Serumprobe zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,2 % BSA in PBS wurden gebundenes IgG mit

einem spezifischen Antikörper (100 µl α-human-IgG/AP, 1:2000 in 0,2 % BSA) markiert und durch eine Farbreaktion mittels Alkalischer Phosphatase detektiert.

### 3.5.9.3 Alkalische Phosphatase

Zur Proteindetektion über eine AP/Substrat-vermittelte Farbreaktion wurden 100 µl Färbereagenz pro Loch zugegeben und die ELISA-Platte 30 – 60 min im Dunklen entwickelt. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte durch Extinktionsbestimmung bei 405 nm im ELISA-Reader.

<i>Färbereagenz:</i>	1	mg/ml	p-Nitrophenylphosphat (PNPP) in DEA-Lösung
<i>DEA-Lösung, pH 9,6</i>	10	%	Diethanolamin
	0,45	mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,04	%	NaN <sub>3</sub>

### 3.5.9.4 Peroxidase-Färbung

Zur Proteindetektion über eine HRP/Substrat-vermittelte Farbreaktion wurden 200 µl Färbelösung pro Loch zugegeben und die Mikrotiterplatte 2 min im Dunklen inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 12,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Farbreaktion durch Extinktionsbestimmung bei 492 nm (Referenz 640 nm) im ELISA-Reader ausgewertet.

<i>Färbelösung:</i>	150	mM	Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0
	3,1	mM	o-Phenylendiamin
	0,01	%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 3.5.10 <sup>125</sup>I-Kapsidmarkierung

Die Markierung der Proteinkapside erfolgte durch Freisetzung von reaktiven <sup>125</sup>I<sub>2</sub> aus Na<sup>125</sup>I (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) mit Hilfe von Iodo-Beads® (PIERCE), nichtporösen Polystyrenkugeln mit immobilisiertem N-Chloro-benzolsulfonamid als Oxidationsmittel.

**Iodinierungsreaktion:** Für die Markierung von Kapsidprotein wurde ein Iodo-Bead 2 x in 500 µl PBS gewaschen, in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 5 min bei RT mit 100 µl Na<sup>125</sup>I in PBS (0,5 mCi) vorinkubiert und dann 100 µl Kapsidlösung (100 µg VP) zugegeben. Die Reaktion bei RT wurde nach 10 min durch Entfernen des Reaktionsgemisches vom immobilisierten Oxidationsmittel abgestoppt.

**Gelfiltration:** Der Na<sup>125</sup>I-Überschuß wurde mittels Gelfiltration aus der Proteinprobe entfernt. Dazu wurde eine 2 ml-Gelfiltrationssäule (D-Salt™ Excellulose™ Plastic desalting Columns; PIERCE) mit 5 vol PBS äquilibriert und 200 µl Reaktionsgemisch aufgetragen. Nach Einlaufen

der Probe wurde die Säule mit 200 µl PBS gewaschen und mit 10 x 200 µl PBS eluiert. Die markierte Kapsidfraktion konnte mit einem  $\beta/\gamma$ -Handdetektor (LB122; BERTHOLT) identifiziert werden. Die Proteinausbeute in den Gelfiltrationsfraktionen wurde anhand einer Parallelfiltration mit unmarkierten Kapsiden quantifiziert.

### 3.5.11 Liposomenherstellung

Die Liposomen wurden mit Hilfe des LiposoFast™-Basic Liposomenextruders (AVESTIN, Ottawa, Kanada) hergestellt. Dazu wurden die benötigten Mengen von in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1 v/v) gelösten Lipide und gegebenenfalls der Fluoreszenzmarker DPH (MOLECULAR PROBES, Eugene, USA) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt, unter  $\text{N}_2$  zur Trockne eingengt und die Probe zur vollständigen Entfernung von Lösungsmittel 1 h unter Vakuum getrocknet. Die Lipide wurden, wenn nicht anders angegeben, in PBS durch Vortexen und/oder im Ultraschall-Wasserbad resuspendiert und die trübe Lipidsuspension 31 x durch eine Polycarbonat-Membran mit 100 oder 200 nm Porengröße (AVESTIN) passagiert.

#### *Lipid-Stammlösungen:*

asialo-Gangliosid <sub>GM1</sub> (asialo-GM1)	1 mg/ml; ~ 0,74 mM
Cholesterol	125 µg/ml
DPH (Fluoreszenzmarker):	1 mM
Globopentaosylceramid (Gb5Cer)	1 mg/ml; ~ 0,64 mM
Globosid (Gb4Cer)	1 mg/ml; ~ 0,74 mM
Globotriaosylceramid (Gb3Cer)	1 mg/ml; ~ 0,87 mM
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin, $\beta$ -Oleoyl- $\gamma$ -Palmitoyl (C18:1, [cis]-9/C16:0) (POPC)	25 mg/3 ml; 11 mM
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin	1 mg/ml

### 3.5.12 Kapsid-Rezeptor-Bindungsassays (BA)

#### 3.5.12.1 BA mit fluoreszenz-markierten Liposomen

Fluoro Nunc™ Platten mit Maxisorp-Oberfläche (96-well, NUNC, Wiesbaden) wurden ÜN bei 4°C mit 400 ng/Loch  $\alpha$ -VP2 (angereicherte IgG-Fraktion in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer, pH 9,5 verdünnt) beschichtet und nach 3 x Waschen mit PBS mit 3 % BSA in PBS 2 h bei RT geblockt. Nach 1 h Inkubation mit 1,4 µg VP2-Kapsid/Loch (in 0,2 % BSA in PBS) bei RT wurde 4 x mit PBS gewaschen und der entstandenen Kapsidschicht DPH-markierte Liposomen für 1 h bei RT präsentiert. Nach Verwerfen der Liposomensuspension wurden auf der Platte verbliebene Liposomen in 200 µl 0,1 % SDS/Loch resuspendiert und die Fluoreszenz im ELISA-Reader (Fluoroskan Ascent (FL) microplate fluorometer Type 374; LABSYSTEMS, Helsinki, Finnland) oder Fluorimeter (ISA FluoroMax-2®; SPEX Instruments) bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm nach Anregung bei 355 nm vermessen. Globosid wurde mit einem molaren Verhältnis von 1:5 in Liposomen integriert, die aus L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin und Cholesterol in einem molaren

Verhältnis von 1:1 aufgebaut waren. Pro  $\mu\text{mol}$  Lipid wurden 0,16  $\mu\text{mol}$  DPH zur Markierung zugegeben. In Kontroll-Liposomen wurde der Globosidanteil durch Phosphatidylcholin ersetzt.

### 3.5.12.2 BA mit radioaktiv-markierten rekombinanten Proteinkapsiden

Sämtliche Versuchsansätze wurden mindestens als Drei-, z.T. als Sechsfachbestimmungen durchgeführt. Pro Loch einer Immuno BreakApart Modulplatte mit Polysorp-Oberfläche (NUNC) wurden 5  $\mu\text{g}$  Lipid (ca. 4 nmol) in 100  $\mu\text{l}$  MeOH pipettiert und ÜN bei 4°C inkubiert. Nach Einengen des Lösungsmittels im Ekksikator wurden unspezifische Bindungsstellen mit 3 % BSA in PBS (1h; RT) abgeblockt. Anschließend wurden je Loch 0,28 pmol  $^{125}\text{I}$ -markierte Kapside in 0,2 % BSA zugesetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Für Konkurrenzexperimente wurde die Kapside vor Zugabe mit dem zu testenden Kompetitor vorinkubiert. Nach 4 x Waschen mit PBS wurde die Reaktionslöcher durch einfaches Brechen voneinander getrennt und die pro Loch auf der Platte verbliebene Radioaktivität für 5 min im Gamma-Counter quantifiziert. Zur Detektion und quantitativen Messung der Gamma-Strahlung wurde das vollautomatische Gamma Counting System Modell 5003 der Cobra II Serie (PACKARD INSTRUMENTS, Meriden, USA) mit einem 3-inch Detektor und geräteeigener Software verwendet.

### 3.5.12.3 VOPBA: *Virus overlay protein binding assay*

Mittels des VOP-Bindungsassays wurden Interaktionen zwischen radioaktiv markierten Virus-kapsiden und immobilisierten Membranproteinen analysiert.

**Proteinauftrennung und Proteintransfer auf immobilisierende Membran:** Wenn nicht anders angegeben wurden 50 – 100  $\mu\text{g}$  Protein aus Membranproteinfraktionen (3.5.1.4) in 10 % PAA-Gelen unter nichtreduzierenden (3.5.2.1) oder nativen Bedingungen (3.5.2.2) getrennt. Es wurde eine Gelgröße von 14 x 16 cm (13,5 cm Trenngel) verwendet. Alternativ wurden die Proteine mittels 2D-Elektrophorese wie unter 3.5.2.2 beschrieben separiert. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,45  $\mu\text{m}$ ; MILLIPORE, Bedford, USA) geblottet. Vor dem Transfer wurde die Membran 10 sec mit MeOH behandelt, 2 min mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und für 5 min in Transferbuffer vorinkubiert. Im weiteren erfolgte der Proteintransfer wie unter 3.5.5.1 beschrieben. Zur Kontrolle der Kapsidbindung wurden Aliquots geeigneter Antikörperlösungen direkt auf eine PVDF-Membran aufgebracht und angetrocknet. Die Kontrollmembran wurde bei den weiteren experimentellen Schritten mitgeführt.

**„Quasi“-Renaturierung und Kapsidinkubation:** Die Membran wurde ÜN in 250 ml Renaturierungspuffer bei 4°C eingelegt. Nach Zugabe von  $^{125}\text{I}$ -markierten Kapsiden in frischem Renaturierungspuffer wurde weitere 4 h bei RT inkubiert und anschließend 4 x 30 min bei RT in Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran wurde die gebundene Radio-

aktivität in der Autoradiographie mit Kodak BioMax™MS-Filmen (SIGMA) oder mittels Phospho-Imaging (GS-363 Molecular Imager System, Imaging Screen-BI und Molecular Analyst™ Software Version 1.4/440; BIORAD) nachgewiesen.

<i>Renaturierungspuffer:</i>	10	mM	HEPES, pH 7,4
	50	mM	NaCl
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	mM	DTT
	0,1	mM	EDTA
	10	%	Glycerin
	3	%	BSA Fraktion V, pH 5,2
	1 Tablette / 200 ml		<i>complete</i> Proteaseinhibitoren

<i>Waschpuffer:</i>	wie Renaturierungspuffer, aber		
	150	mM	NaCl
	0,03	%	Nonidet NP40 (ROCHE)
	0,2	%	BSA

### 3.5.13 Surface Plasmon Resonance

Alle Puffer wurden vor Gebrauch entgast und mit einem 0,22 µm Filter von groben Verunreinigungen befreit. Die Messung von Oberflächenplasmon-Resonanz an Lipidschichten erfolgte an einem Pioneer L1 Sensorchip im BIACORE J Biosensor (Uppsala, Schweden), der die gleichzeitige Messung in einem Referenzkanal ermöglicht. Die Dextranoberfläche des Sensorchips ist mit lipophilen Substanzen modifiziert, die den Aufbau von Lipidschichten ermöglichen. Der Aufbau einer Lipidschicht erfolgt mit Hilfe von Liposomen. Das Beladungsprotokoll ist in Tabelle 14 exemplarisch für das Globosid/POPC-System dargestellt. Die Herstellung der 3 mM Ausgangslipidsuspension, die zur Injektion 1:2 in Liposomenpuffer verdünnt wurde, ist unter 3.5.11 beschrieben. Nach der Beladung der Sensorchip-Oberfläche konnten Aliquots der zu testenden Substanzen in geeigneten aufsteigenden Konzentrationsreihen injiziert werden. Die Injektionszeit betrug standardmäßig 3 min und wurde bei Bedarf erhöht.

<i>Liposomenpuffer:</i>	10	mM	Tris/HCl, pH 7,4
	50	mM	NaCl
	0,9	mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,49	mM	MgCl <sub>2</sub>

*Liposomenpuffer (ohne)* enthält kein Calcium- und Magnesiumchlorid.

<i>Laufpuffer:</i>	10	mM	Tris/HCl, pH 7,4
	150	mM	NaCl

<i>Laufbedingung:</i>	Temperatur	25°C
	Laufgeschwindigkeit	15 µl/min

*Tabelle 14: Beladungsprotokoll für den Aufbau einer Gb4Cer/POPC-Schicht im Probenkanal (Fc1) und einer reinen POPC-Lipidschicht im Referenzkanal (Fc2).*

Injektionslösung	aktiver Flußkanal		Injektionszeit	Bemerkungen
	Fc1	Fc2		
	x	x	Laufpuffer	Andocken des Chips
40 mM Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid in H <sub>2</sub> O	x	x	3 min	Reinigung der Chipoberfläche
	x	x	Laufpuffer	Spülen
gegebenenfalls Wiederholung der Chipreinigung				
1,5 mM POPC-Liposomen in Liposomenpuffer		x	15 min	Beladung des Referenzkanals durch Generierung einer Lipidschicht
		x	Laufpuffer	Spülen
100 mM NaOH in H <sub>2</sub> O		x	3 min	Beseitigung freier Liposomen
		x	Laufpuffer	Spülen
	x		Laufpuffer	Spülen
1,5 mM Gb4Cer/POPC-Liposomen in Liposomenpuffer	x		15 min	Beladung des Probenkanals
	x		Laufpuffer	Spülen
100 mM NaOH in H <sub>2</sub> O	x		3 min	Beseitigung freier Liposomen
	x		Laufpuffer	Spülen
	x	x	Laufpuffer	Spülen

### 3.5.14 Mikrokolorimetrie

In der Meßzelle wurde eine 0,1 mM VP2-Kapsidproteinlösung (1,67  $\mu$ M Kapside) in PBS mit festen Volumina einer 0,5 mM Glycolipidsuspension in PBS titriert. In Tabelle 15 sind die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Bedingungen aufgezeigt. Sämtliche Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und temperiert.

*Tabelle 15: Standardversuchsbedingungen am Mikrokalorimeter (VP-ITC MicroCalorimeter; MICROCAL INC., Northampton, USA).*

<b>Temperatur</b>	15°C
<b>Referenzleistung</b>	5 µcal/sec
<b>Proteinkonzentration in der Meßzelle</b>	ca. 0,1 mM
<b>Rührgeschwindigkeit</b>	270 rpm
<b>Initiale Verzögerung und Abstand zwischen einzelnen Injektionen</b>	200 sec
<b>Anzahl der Injektionen</b>	20
<b>Konzentration der injizierten Lösung</b>	0,5 mM
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µl
<b>Injektionsdauer</b>	20 sec

### 3.5.15 Hämagglutinationsanalyse

Die Durchführung der Hämagglutinationsassays mit dem DIAMED-ID-Parvovirus B19 Micro Typing System (DIAMED, Cressier sur Morat, Schweiz) richtete sich weitgehend nach den Angaben des Herstellers. Allerdings wurden 15 µl Probe und 15 µl Erythrocytensuspension eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben betrug die Erythrocyten-Endkonzentration im HA-Ansatz 0,15 %. Die Auswertung erfolgte visuell, Erythrocyten (rote Bande) auf oder im Säulenmaterial bedeuten Hämagglutination (HA), d.h. die Erythrocyten wurden durch die Probe vernetzt, findet keine HA statt, gelangen die Erythrocyten während durch die Zentrifugation zum Säulenboden.

### 3.5.16 Mikroskopie

#### 3.5.16.1 Negativkontrastierung und Transmissions-EM

Für die Negativkontrastierung wurden kohlebeschichtete Kupfer-Netze mit einer Maschenweite 400 (PLANO, Wetzlar) verwendet. Diese Trägergrids wurden zu Beginn der Arbeiten beglimmt, d.h. durch Ionisierung von Restmolekülen in reduzierter Gasatmosphäre unter UV hydrophilisiert, die Proteinprobe aufgetragen, 45 sec bis 1 min inkubiert und anschließend 1 x 30 sec mit H<sub>2</sub>O bidest gewaschen. Die Probe wurde 45 sec mit 3 % Uranylacetat (w/v in H<sub>2</sub>O bidest) kontrastiert und auf Filterpapier getrocknet. Die Grids wurden mit einem Transmissions-EM Philips CM12 (PHILIPS, Eindhoven, Niederlande) bei einer Hochspannung von 120 kV, d.h.

einem Fokussierstrahldurchmesser von 100 – 200 nm betrachtet. Die Bildverarbeitung erfolgte entweder mittels eines AGFA Scientia EM-Film 23D56 oder einer *slow scan* CCD-Kamera (FA.TIETZ, Gauting).

### 3.5.16.2 Immunfluoreszenz

Auf einen Objektträger für die Immunfluoreszenz ER-302 (MENZEL-Gläser, Braunschweig) wurden 10 µl Zellsuspension ( $\sim 1 \times 10^6$  Zellen) pro Loch aufgebracht (Monolayer) und 30 min bei RT unter einer Laminarbox getrocknet. Die Zellen wurden 30 min in Aceton bei  $-20^\circ\text{C}$  fixiert und anschließend 2 x mit PBS und 1 x mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Nach 1 h Inkubation mit Blockierungsreagenz bei  $37^\circ\text{C}$  wurden 20 µl Antikörper (Serumverdünnung 1:20) zugegeben und in einer feuchten Kammer für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 3 x 3 min waschen mit PBS wurde kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und der Objektträger getrocknet. Die Probe wurde mit 15 µl FITC-markiertem sekundären Antikörper (1:50) für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde wieder 3 x 3 min mit PBS gewaschen, nach Trocknen des Objektträgers Fluoreszenzverstärkungsgel (Vectashield<sup>®</sup>H-1000, VECTOR LABS, Burlingame, USA) aufgetragen und die Probe mikroskopiert.

*Fluoreszenzmikroskop Olympus Provis AX70 mit U-MCB, U-PS (MIKRO-OPTIK-MÜNCHEN)  
Sony 3CCD Color Videokamera Modell PXC-950P mit Adapter CMA-D2 (SONY, Tokio, Japan)*



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Herstellung eines Kaninchen anti-VP2 Antiserum

Für die Proteindetektion und als immobilisierender Träger für Bindungsassays wurde ein spezifischer Antikörper gegen das virale B19-Strukturprotein VP2 in ausreichender Menge benötigt. Zu dessen Gewinnung wurde die VP2-codierende Nukleinsäuresequenz in einen Vektor inseriert, der die Expression von N-terminal durch sechs Histidine modifiziertem VP2 in *E.coli* ermöglicht. Das über Affinitätschromatographie gereinigte Protein wurde als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und aus dem gewonnenen Antiserum die IgG-Antikörperfraktion angereichert.

#### 4.1.1 Konstruktion eines Expressionsvektors zur [6xHis]-VP2-Produktion

Für die Expression großer Mengen rekombinanten Antigens in *E.coli* wurde der Vektor pQE40 ausgewählt. Das System ermöglicht am N-Terminus des Zielgens die Einführung eines [6xHis]-Tag und die Fusion mit Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) aus der Maus. Die [6xHis]-Verlängerung dient der Reinigung des rekombinanten Proteins über Metallaffinitätschromatographie, DHFR soll die Stabilität und Antigenität des Zielgens erhöhen. Die IPTG-induzierbare Expression des Zielgens steht unter Kontrolle des Phagen T5 Promoters. Der Vektor trägt zudem ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, das die Ampicillinresistenz zur Selektion plasmidtragender Bakterien vermittelt.

Die Klonierung des VP2-Gens in pQE40 ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Bei der Expression von VP2 sollte auf DHFR als Fusionspartner verzichtet werden. Daher wurde in einem ersten Klonierungsschritt die *multi cloning site* des Vektors pQE40 durch Einführung einer synthetischen Oligonukleotidsequenz modifiziert. Zur Herstellung des Plasmids pQE40-Ascl wurde in die MCS von pQE40 über die Restriktionsstellen *Bam*HI und *Kpn*I ein synthetisches Oligonukleinsäurefragment, dessen Sequenz eine zusätzliche Ascl-Schnittstelle enthält, eingefügt und dabei auch die im ursprünglichen Vektor vorhandene DHFR-codierende Sequenz entfernt.

Das Insertfragment mit entsprechenden kompatiblen überhängenden Enden wurde durch *Annealing* der Oligonukleotide QE\_AscI/1 und QE\_AscI/2 gewonnen und mit dem *Bam*HI/*Kpn*I-geschnittenen und anschließend gelgereinigten pQE40-Vektorfragment ligiert.

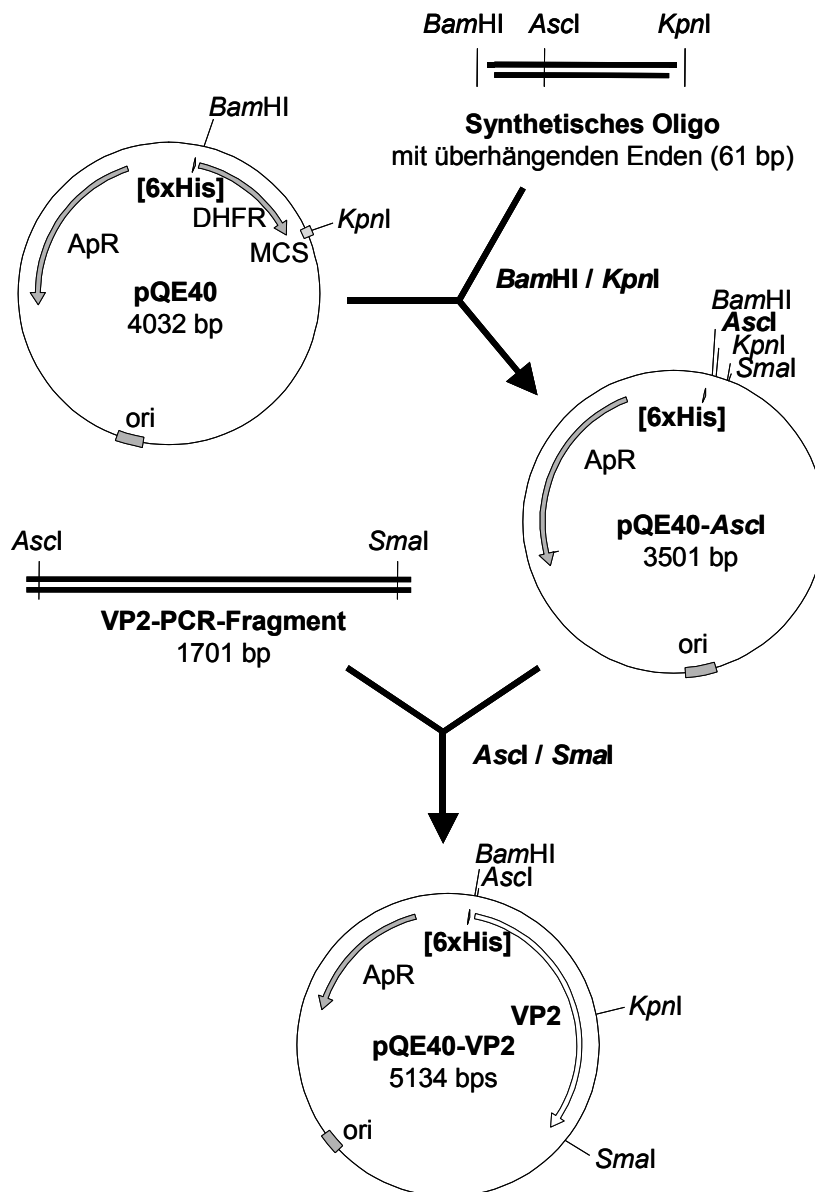


Abbildung 6: Klonierungsschema zur Herstellung des Expressionsplasmids pQE40-VP2.

Nach Transformation von *E.coli* SURE konnte der Vektor pQE40-Ascl in präparativem Maßstab isoliert und mittels Ascl-Testspaltung (Abbildung 7) charakterisiert werden. Das Plasmid pQE40-Ascl diente als Ausgangsvektor zur Klonierung des Expressionsvektors pQE40-VP2. Die VP2-codierende Sequenz wurde mit Hilfe des *Expand High Fidelity PCR Systems* (ROCHE, Mannheim) und der Primer QE-VP2\_1 und QE-VP2\_2 aus dem Vektor pUC18-VP1 amplifiziert und im Gel aufgereinigt. Das VP2-PCR-Fragment und der Vektor pQE40-Ascl wurden mit den Restriktionsenzymen Ascl und SmaI doppelgeschnitten, ligiert und *E.coli* SURE transformiert. Die Identität des isolierten Plasmids pQE40-VP2 konnte durch KpnI-Testspaltung im VP2-Insert und durch Sequenzierung (siehe Anhang) bestätigt werden.

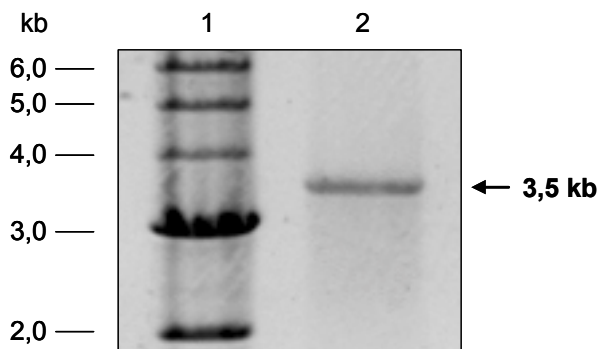


Abbildung 7: Nachweis der neu eingeführten Schnittstelle und Bestätigung der korrekten Konstruktgröße durch Testspaltung des Vektors pQE40-Ascl mit dem Restriktionsenzym Ascl.

Spur (1) 1 kb-Standard und (2) linearisierter Vektor. 1% Agarose.

#### 4.1.2 Expression und Reinigung von rekombinantem [6xHis]-VP2

Nach Transformation von *E.coli* SG13009 mit dem neukonstruierten Vektor pQE40-VP2 wurde die Expression des rekombinanten [6xHis]-VP2-Proteins nach Induktion mit 1 mM IPTG in der SDS-PAGE nachgewiesen (Abbildung 8).

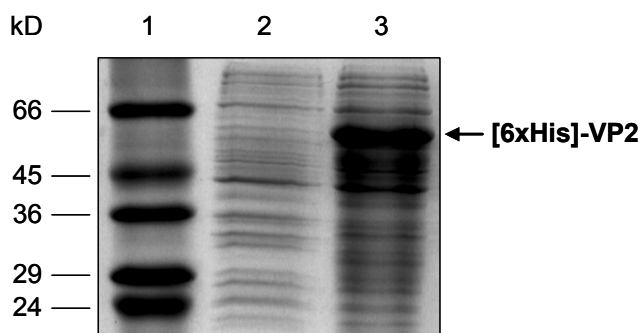


Abbildung 8: Nachweis der IPTG-induzierten [6xHis]-VP2-Expression in Zellysaten von *E.coli* SG13009 pQE40-VP2.

Spur (1) HMW-Standard, (2) nicht-induzierte und (3) 0,2 M IPTG-induzierte Zellen. 12,5 % SDS-PAA-Gel, coomassiegefärbt.

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte unter denaturierenden Bedingungen aus *Inclusion bodies*. Die Bakterien (4 h mit 1 mM IPTG induziert) wurden durch Hochdruckdispersion in der *French Press* aufgeschlossen und die durch Zentrifugation separierten [6xHis]-VP2-enthaltenden *Inclusion bodies* in 8 M Harnstoff unterstützt durch Ultraschallbehandlung solubilisiert. Das von unlöslichen Bestandteilen gereinigte Lysat wurde auf eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionenaustausch-Affinitätschromatographiesäule aufgetragen und gebundene Proteine nach mehreren Waschschritten in einem Imidazolgradienten (0 bis 0,3 M in harnstoffhaltigem Puffer) eluiert. Die Proteinfraktion wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm und SDS-PAGE determiniert (Abbildung 9) und die vereinigten [6xHis]-VP2-positiven Fraktionen (Elutionsfraktionen 30 – 50) auf ein Endvolumen von 3,5 ml aufkonzentriert.

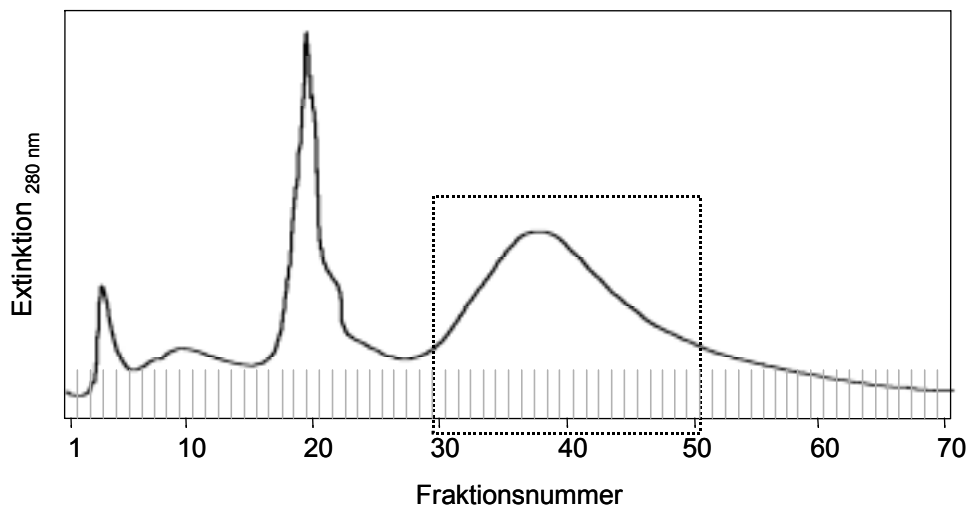


Abbildung 9: Elutionsprofil zur Reinigung von [6xHis]-VP2 über  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionenaustausch-Affinitätschromatographie. (.....) [6xHis]-VP2-positiver Elutionsbereich. Adsorptionsflußrate: 2 ml/min; Wasch- und Elutionsflußrate: 1,5 ml/min; Fraktionsvolumen: 5 ml.

Das durch Affinitätschromatographie vorgereinigte [6xHis]-VP2 wurde mittels präparativer SDS-PAGE (PrepCell) hoch aufgereinigt. Dazu wurden 2,5 ml der aufkonzentrierten [6xHis]-VP2-Probe mit Probenpuffer versetzt, in einem 12,5 %-igen SDS-PAA-Gel aufgetrennt und kontinuierlich eluiert. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden mittels analytischer SDS-PAGE (Abbildung 10) kontrolliert und die [6xHis]-VP2-positiven Fraktionen 43 – 56 auf ein Endvolumen von circa 1,2 ml (1,22 mg/ml) aufkonzentriert. Die Präparationsausbeute an hochgereinigtem [6xHis]-VP2 betrug ungefähr 2 mg/l *E.coli*-Kultur.

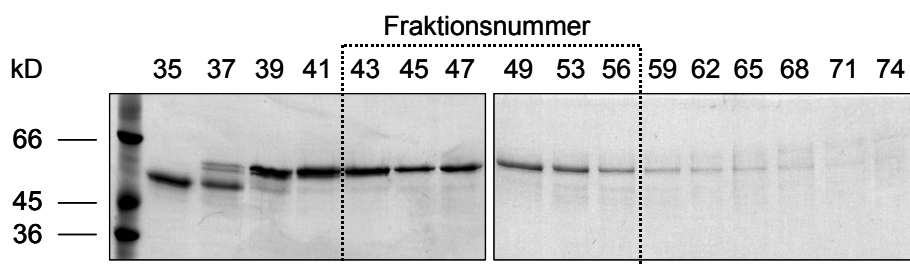


Abbildung 10: Kontrollgele zur [6xHis]-VP2-Reinigung über präparative SDS-PAGE. Standard: LMW; (.....) [6xHis]-VP2-Elutionsbereich. 12,5 % SDS-PAA-Gele, coomassiegefärbt.

### 4.1.3 Immunisierung und Charakterisierung des Antiserums

Das mittels PrepCell gereinigte und anschließend aufkonzentrierte [6xHis]-VP2 wurde direkt zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Nach Abnahme von Prä-Immunsrum zur Kontrolle wurde das VP2-Protein mit TiterMax<sup>®</sup> Adjuvants emulgiert und zwei Chinchilla-Bastarden (Tier Nr. 251 und 261) entsprechend dem Immunisierungsprotokoll (Tabelle 16) injiziert. Am Tag 47 nach Primärimmunisierung wurden die Tiere ausgeblutet und 52,6 ml Antiserum 251 bzw. 48,8 ml Antiserum 261 gewonnen.

Tabelle 16: Immunisierungsprotokoll.

Tag		Injektion	VP2-Menge
0	Primärimmunisierung	subkutan / intramuskulär	je 100 µg VP2
27	Boost-Immunisierung	subkutan / intramuskulär	je 100 µg VP2
47	Serumabnahme		

Die spezifische Reaktivität der Antiseren wurde im *recomBlot*, einem kommerziell erhältlichen Immunoblottest mit rekombinant produzierten und gelelektrophoretisch aufgetrennten Antigenen zur Diagnostik von anti-Parvovirus B19-IgG, und mittels eines ELISA (3.5.9.2) gezeigt. Für die Charakterisierung im *recomBlot* wurden die Antiseren 1:100 bis 1:16000 verdünnt und der Test nach Herstellerangaben durchgeführt.

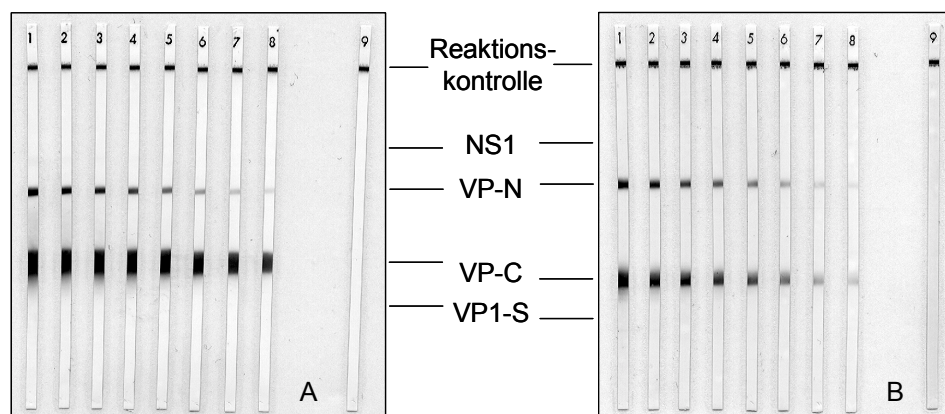


Abbildung 11: Bestimmung der IgG-Serumreaktivität von (A) Antiserum 251 und (B) Antiserum 261 mittels *recomBlot*-Teststreifen. Serumverdünnung auf Teststreifen (1) 1:100, (2) 1:250, (3) 1:500, (4) 1:1000, (5) 1:2000, (6) 1:4000, (7) 1:8000, (8) 1:16000 und (9) Präserum 1:100 als Negativkontrolle.

Die  $\alpha$ -VP2 Antiseren reagierten erwartungsgemäß in allen gewählten Verdünnungsstufen positiv mit den einander überlappenden N-terminalen (VP-N) und C-terminalen (VP-C)

Bereichen der Strukturproteine, aber nicht mit der für VP1 spezifischen *unique region* (VP-1S) oder dem Nichtstrukturprotein NS1. Antiserum 251 zeigt im Vergleich zu Antiserum 261 eine sehr dominante Reaktivität gegen VP-C (Abbildung 11). Der ELISA-Test bestätigte die hohe Reaktivität der beiden Antiseren einschließlich der Verdünnungsstufen 1:128000 (Antiserum 251) bzw. 1:64000 (Antiserum 261). Durch die *Boost*-Immunisierung wurde die Immunantwort gegen [6xHis]-VP2 signifikant gesteigert (Abbildung 12).

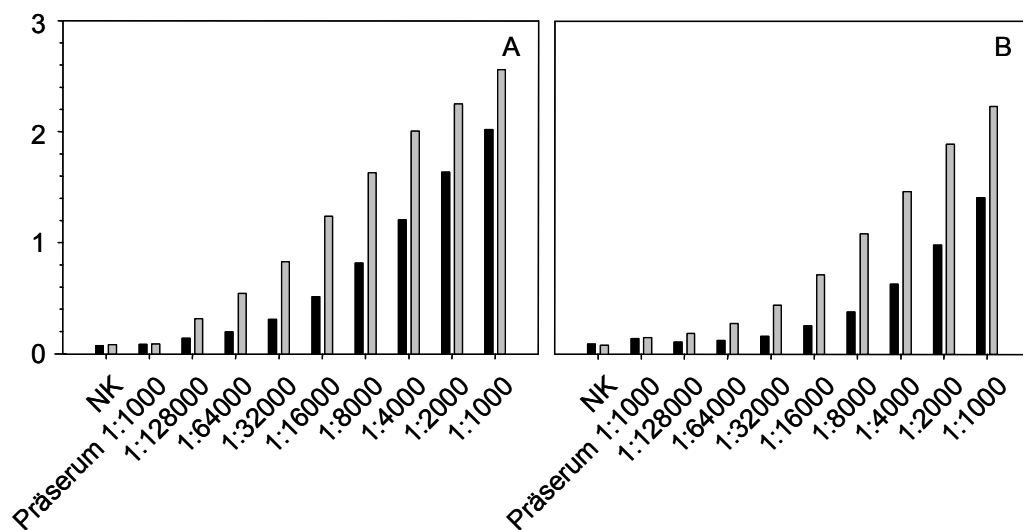


Abbildung 12: Bestimmung der Serumreaktivität gegen rekombinantes VP2 im ELISA. (A) Antiserum 251 und (B) Antiserums 261. (■) vor und (■) nach Boost-Immunisierung, NK-Negativkontrolle.

Um als immobilisierenden Träger für nachfolgende Bindungsassays eine spezifische Antikörperlösung bekannten Proteingehaltes zur Verfügung zu haben, wurde die IgG-Fraktion aus 16,5 ml Antiserum 261 über Protein G-Sepharose gereinigt und damit auch die VP2-spezifischen Antikörper angereichert. Der Proteingehalt der 1 ml-Elutionsfraktionen wurden durch eine Farbreaktion nach Bradford bestimmt (Abbildung 13).

Mit Abschluß der IgG-Anreicherung standen ausreichende Mengen eines spezifischen Antikörpers gegen das virale B19-Strukturprotein VP2 zum Einsatz als immobilisierender Träger für Bindungsassays zur Verfügung. Zur Proteindetektion in WesternBlot-Analysen war die Verwendung der Antiseren  $\alpha$ -VP2 251 und  $\alpha$ -VP2 261 ausreichend.

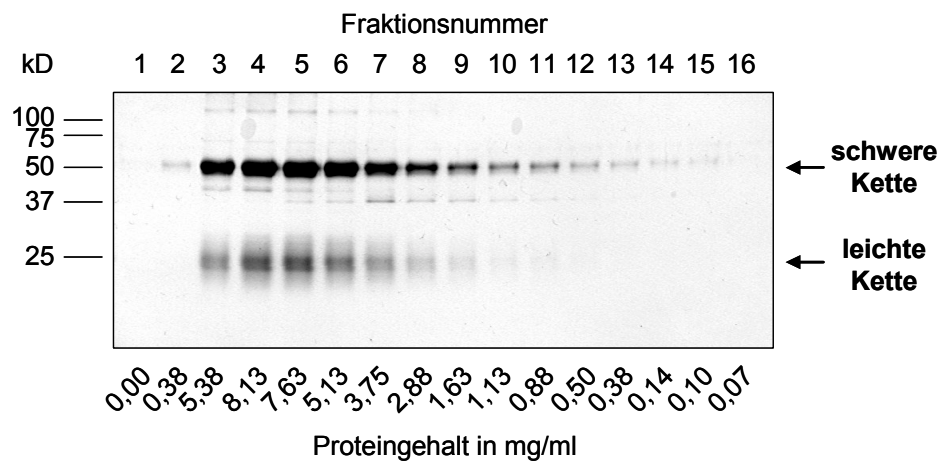


Abbildung 13: Anreicherung der IgG-Fraktion aus Antiserum 261 über Protein G-Sepharose. Adsorptions- und Elutionsflußrate: 1 ml/min. 15% SDS-PAA-Gel, silbergefärbt.

## 4.2 Produktion und Charakterisierung rekombinanter B19-Proteinkapside

### 4.2.1 Herstellung homogener VP2-Kapside in Insektenzellen

*In vivo*-Untersuchungen zur Virusstruktur und Infektionsmechanismen von Parvovirus B19, wie z.B. Wechselwirkungen von Viruskapsiden mit Zelloberflächen und spezifischen Rezeptoren, sind nur schwer durchführbar, da kein effizientes Zellkultursystem zur Vermehrung der Viren zur Verfügung steht. Effektiv repliziert Parvovirus B19 nur in primären Kulturen humaner erythroider Knochenmarkszellen (Ozawa *et al.*, 1986) oder primären fötalen Leberzellen (Yaegashi *et al.*, 1989), deren Verwendung infolge eingeschränkter Zugänglichkeit des Zellmaterials begrenzt ist. Allerdings ist es möglich, leere Kapside durch Expression rekombinanter Kapsidproteine in Insektenzellen herzustellen. Das Baculovirus-Expressionssystem wurde schon mehrfach erfolgreich für die Synthese großer Kapsidmengen verwendet, wie z.B. zur Herstellung von Poliovirus-Partikeln (Urakawa *et al.*, 1989) oder Kapsiden des *Flock House Virus* (Fisher *et al.*, 1993). Die B19-Proteinkapside werden in den Insektenzellen durch einen Selbstassemblierungsprozeß der rekombinanten Strukturproteine gebildet, wobei das Hauptstrukturprotein VP2 (58 kD) allein ausreichend für die Partikelbildung ist. Die entstehenden regulär geformten Kapside sind elektronenmikroskopisch und abgesehen vom Fehlen der VP1-spezifischen *unique region* immunchemisch nicht von intakten Virionen unterscheidbar (Brown *et al.*, 1991; Kajigaya *et al.*, 1991) und können daher für *in vitro*-Analysen der Virus / Rezeptor-Wechselwirkung genutzt werden.

Dem Labor von Prof. Susanne Modrow wurde dankenswerter Weise durch Dr. Manfred Motz ein rekombinantes Baculovirus (AcMNPV-VP2) überlassen, in dessen Fremdgen-Expressionskassette die VP2-Sequenz eines Patientenisolates inseriert wurde. Ausgehend davon wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression des VP2-Proteins in infizierten Sf9-Insektenzellen überprüft und ein Protokoll zur Reinigung der rekombinanten Kapside, die für die weiteren Untersuchungen zur Rezeptor-Kapsid-Wechselwirkung notwendige Voraussetzung sind, etabliert und optimiert.

### 4.2.1.1 Charakterisierung des Baculo/Sf9-Expressionssystems

Die Grundlage für die Etablierung der Kapsidreinigung war die Absicherung der Funktionalität des Expressionssystems. Da die genaue Sequenz des in AcMNPV inserierten VP2-Gens nicht bekannt war, wurde der VP2-Genbereich innerhalb des Baculovirus-Genoms sequenziert. Für die Sequenzierung wurde ein Aliquot des propagierten Baculovirusstocks 1:2 in Wasser verdünnt, 15 min bei 95°C aufgekocht und hochmolekulare Verunreinigungen durch Zentrifugation (14000 rpm, 15 min) beseitigt. Der Überstand wurde als Template-DNA für einen PCR-Ansatz verwendet, in dem das VP2-Gen mit geeigneten Primern amplifiziert wurde. Durch Sequenzierung des gereinigten PCR-Produktes wurde die Vollständigkeit des offenen Leserahmens nachgewiesen. Aus der codierenden Sequenz konnte die Proteinsequenz des rekombinanten VP2 abgeleitet werden. Die Punktmutationen in der Nukleinsäuresequenz hatten nur in zwei Fällen Auswirkung auf die resultierende Proteinsequenz im Vergleich zum Standardisolat pYT103 (Shade *et al.*, 1986). Der Austausch Ser229Thr ist auch bei anderen Parvovirus B19-Isolaten (B19-Wi und B19 Stu) präsent (Blundell *et al.*, 1987; Hicks *et al.*, 1996). Der Aminosäureaustausch Thr145Ala konnte in den zum Vergleich herangezogenen Isolaten nicht gefunden werden. Der Aminosäurerest 145 ist Bestandteil von Strang D des zentralen  $\beta$ -barrel Strukturmotivs und nicht oberflächenexponiert (Agbandje *et al.*, 1994). Der Austausch sollte daher keine Auswirkung auf die Rezeptorbindung haben.

Zur weiteren Charakterisierung des Expressionssystems wurden Sf9-Insektenzellen mit AcMNPV-VP2 (MOI 2,5) infiziert und die Expression des rekombinanten VP2-Proteins drei Tage nach Virusinokulation im WesternBlot mit  $\alpha$ -VP2 Antikörper nachgewiesen. Das exprimierte VP2-Protein hatte bei Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard die erwartete Größe von 58 kD. Die Effizienz der Sf9-Infektion unter den gewählten Bedingungen wurde mittels Immunfluoreszenz gezeigt. Die Insektenzellen wurden mit AcMNPV-VP2 infiziert und ein, zwei bzw. drei Tage nach Virusinokulation geerntet. Nach Fixierung der infizierten Sf9-Zellen auf einen Objektträger wurde das rekombinante VP2-Protein in den Zellen immunchemisch fluoreszenzmarkiert. Zu allen Erntezeitpunkten konnte die Expression von VP2 nachgewiesen werden. Während VP2 24 h nach Infektion (*p.i.*) nur in einigen Zellen beobachtet werden konnte, exprimierten 2 Tage *p.i.* alle Zellen nachweisbare Mengen an VP2 (Abbildung 14). 72 Stunden nach



Virusinokulation war ein deutlicher Verlust intakter Zellen in der Kultur zu verzeichnen. Da in nachfolgenden Kapsidpräparationsansätzen das Zellpellet als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, würde die Ernte 3 Tage *p.i.* große Protein- und damit Kapsid-Verluste nach sich ziehen. Als Kompromiß zwischen maximaler Proteinexpression und geringstmöglichem, aus dem Absterben von Sf9-Zellen resultierenden Materialverlust wurde der Erntezeitpunkt für AcMNPV-VP2-infizierte Sf9-Insektenzellen für Kapsidpräparationen auf 60 h nach Virusinokulation festgelegt.

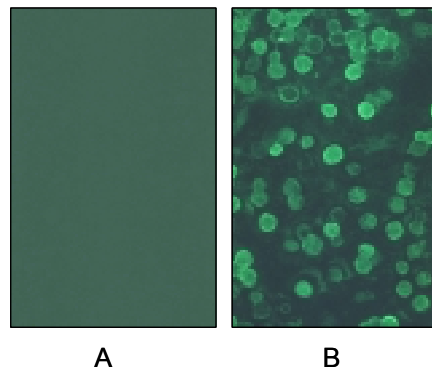


Abbildung 14: Nachweis rekombinan-  
ten VP2-Proteins in Sf9-Insektenzellen  
mittels Immunfluoreszenz.

Bild (A) nichtinfizierte Sf9-Zellen und  
(B) AcMNPV-VP2-infizierte Sf9-Zellen,  
2 d nach Virusinokulation. Immun-  
chemischer VP2-Nachweis:  $\alpha$ -VP2 /  
 $\alpha$ -rabbit-IgG, FITC-markiert.

#### 4.2.1.2 Etablierung eines Kapsidreinigungsprotokolls

Um ausreichend Proteinmaterial für die Durchführung von *in vitro*-Experimenten zur biophysikalischen und biochemischen Charakterisierung von Kapsid-Rezeptor-Wechselwirkungen zur Verfügung zu haben, wurde ein effizientes Kapsidreinigungssystem benötigt. Ausgangspunkt für die Etablierung und Optimierung eines Kapsidreinigungsprotokolls im Labor waren verschiedene in der Literatur beschriebene experimentelle Bedingungen zur Kapsidpräparation.

Bansal *et al.* (Bansal *et al.*, 1993) beschreiben ein Kapsidreinigungsprotokoll in Anlehnung an Kajigaya *et al.* (Kajigaya *et al.*, 1991). Die mit einer MOI von ca. 5 infizierten Sf9-Insektenzellen wurden 60 – 68 h *p.i.* geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen wurden in Lysispuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM NaCl; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 % Triton X-100; 1 mM PMSF; 0,2 TIU/ml Aprotinin; 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin; 10  $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin A) resuspendiert und durch mehrmaliges Einfrieren ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und Auftauen aufgeschlossen. Das Lysat wurde zur Abtrennung hochmolekularer Verunreinigungen und ganzer Zellen 20 min bei 12000xg zentrifugiert und der Überstand auf ein 40 %-iges (w/v) Saccharosekissen aufgetragen (16 h bei 100000xg,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das resultierende Pellet wurde in TE-TX (50 mM Tris/HCl, pH 8,7; 25 mM EDTA; 1 % Triton X-100; Proteaseinhibitoren siehe Lysispuffer) aufgenommen und abermals durch ein 40 %-iges Saccharosekissen zentrifugiert. Die im Sediment enthaltenen Kapside wurden in TE-OG (50 mM Tris/HCl, pH 8,7; 25 mM EDTA; 1 % Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid; Proteaseinhibitoren siehe Lysispuffer; initiale CsCl-Konzentration 1,31 g/ml) resuspendiert und

im CsCl-Dichtegradienten (35 h bei 100000xg, 4°C) bandiert. Bei eigener Durchführung der Kapsidpräparation nach diesem Protokoll konnte gezeigt werden, daß durch die zweite Saccharosekissenzentrifugation keine Veränderung der Zusammensetzung der kapsidhaltigen Fraktion erreicht werden konnte und dieser Schritt daher höchstens zu Materialverlusten führt. Anhand Coomassie-gefärbter Gele wurde deutlich, daß der Reinigungseffekt der Saccharosekissen nicht ausreichend ist. Die VP2-positiven Fraktionen bandieren im oberen Drittel des CsCl-Dichtegradienten, wie sowohl im direkten Kapsid-ELISA mit dem kapsidspezifischen monoklonalen Antikörper 860-55D als auch im WesternBlot mit  $\alpha$ -VP2 Antiserum gezeigt werden konnte.

Zur Optimierung der Reinigung wurde die Saccharosekissenzentrifugation durch einen Vorreinigungsschritt ersetzt, der ein schonendes Anreichern der Kapside mit effizienter Reinigung verbindet. Zur Kapsidpräparation wurden  $\sim 4 \times 10^8$  infizierte Insektenzellen in 5 ml Lysispuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4; 10 mM NaCl; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 % Triton X-100, *complete* Proteaseinhibitoren) resuspendiert und mittels mehrfachem Einfrieren und Auftauen bei -20°C (3 x) aufgeschlossen. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 2000xg, 10°C wurde das Lysat von ganzen Zellen und großen Zellfragmenten befreit und dann auf ein CsCl-Kissen aufgetragen ( $\zeta = 1,22 \text{ g/cm}^2$  in TE-TX; Puffer wie oben, aber 0,5 % Triton X-100 und ohne Proteaseinhibitoren). In das Kissen wurden die Kapside durch Zentrifugation (4 h; 150000xg; 10°C) sedimentiert. Die opake Proteinbande konnte durch Anstechen des Zentrifugenröhrchen von der Seite mit einer Spritze abgezogen werden. Wurde die Bande vorsichtig abgenommen, stand schon an dieser Stelle eine sehr saubere Kapsidfraktion zur Verfügung (Abbildung 15).

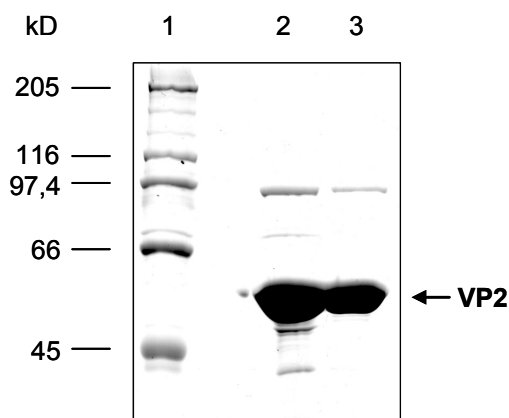


Abbildung 15: Reinigungsdokumentation zu Kapsidpräparationsschritten.

Spur (1) HMW, (2) Kapsidfraktion aus CsCl-Kissen, circa 10  $\mu\text{g}$  Protein, (3) Kapsidfraktion CsCl-Dichtegradient, 10  $\mu\text{g}$  VP2-Protein (58 kD). 10 % SDS-PAA, coomassiegefärbt.

Der Reinigungseffekt im CsCl-Kissen wird durch Trennung nach Dichte und Morphologie erzeugt. Dem reinigenden CsCl-Kissen war ein weiteres dichteres CsCl-Kissen ( $\zeta = 1,52 \text{ g/cm}^2$ ) untergelagert, um große Turbulenzen während der Zentrifugation zu vermeiden. Neben dem zusätzlichen Reinigungseffekt ist die Bandierung im CsCl-Kissen sehr viel schonender als die Pelletierung am Boden des Zentrifugenröhrchens. Ein elektronenmikroskopischer Vergleich von

bandierten bzw. pelletierten Kapsiden zeigte einen signifikanten Anteil von Kapsidbruchstücken in den pelletierten Proben.

Die im CsCl-Kissen vorgereinigte Kapsidfraktion wurden mit CsCl-Lösung ( $\zeta = 1,31 \text{ g/cm}^2$  in TE; 50 mM Tris/HCl, pH 8,7; 25 mM EDTA) gemischt und der Gradient bis zur Gleichgewichtseinstellung 20 h bei 150000xg, 10°C zentrifugiert. In entsprechenden Experimenten wurde gezeigt, daß nach 20 h Zentrifugation das Gleichgewicht im Gradienten stabil war und sich die Dichteverteilung bei verlängerter Zentrifugationszeit nicht mehr veränderte. Kürzere Zentrifugationszeiten z.B. 15 h waren für die Gleichgewichtseinstellung nicht ausreichend. Der Verzicht auf das Detergenz im CsCl-Dichtegradienten hatte keinen Einfluß auf die Qualität der gewonnenen VP2-Kapsidpräparate. Die opake Proteinbande im oberen Drittel des Gradienten (Abbildung 19) wurde von der Seite abgenommen. Den für CsCl-Lösungen verwendeten Puffern wurden keine Proteaseinhibitoren zugesetzt. Die Kapsidfraktionen wurden bei 4°C in CsCl gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden keine Erfahrungen gesammelt, da die Kapside nach Bedarf präpariert wurden. Ein entscheidender Vorteil des hier etablierten Kapsidreinigungsprotokolls liegt in der signifikanten Zeitersparnis. So konnte die Zentrifugationsdauer von 67 h 20 min (Bansal *et al.*, 1993) oder 51 h (Kajigaya *et al.*, 1991) auf 24 h oder sogar 4 h (nur 1.CsCl-Reinigungsschritt) eingeschränkt werden.

Aus der Präparation resultierten hochreine VP2-Kapsidfraktionen reproduzierbarer Qualität (Abbildung 15 und Abbildung 16). Die zusätzliche nicht näher charakterisierte Proteinbande bei ungefähr 96 kD war in den Kapsidpräparationen reproduzierbar. Da der Anteil dieser Verunreinigung am Gesamtproteingehalt kleiner 1 % war, wurde auf weitere Reinigungsschritte und damit einhergehende Materialverluste verzichtet (Abbildung 15). Die Proteinausbeuten der Präparationen lagen zwischen 0,13 bis 0,19 mg VP2-Protein aus  $1 \times 10^8$  Insektenzellen. Die gereinigten Kapsidfraktionen hatten eine Proteinkonzentration zwischen 16,5  $\mu\text{M}$  (1 mg VP2/ml) und 23,44  $\mu\text{M}$  (1,43 mg VP2/ml). Eine VP2-Proteinkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  entspricht einer Kapsidkonzentration von 0,33  $\mu\text{M}$  oder  $2 \times 10^{14}$  Kapsiden/ml.

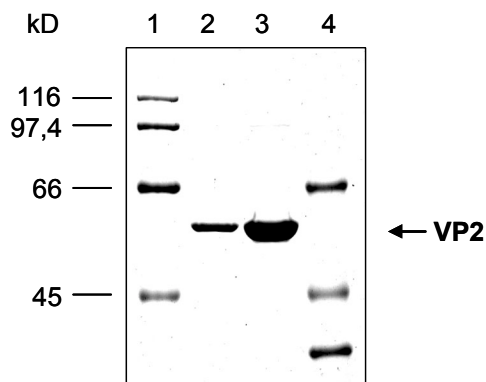


Abbildung 16: Gereinigte VP2-Kapsidfraktion in der SDS-PAGE.

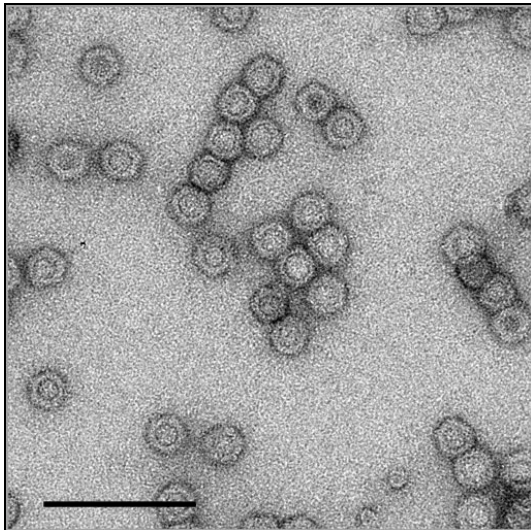
Spur (1) HMW, (2) 0,5  $\mu\text{g}$  VP2-Protein (58 kD), (3) 2,5  $\mu\text{g}$  VP2-Protein und (4) LMW. 10 % SDS-PAA-Gel, coomassiegefärbt.

Weitere Versuche zur Erhöhung der Proteinausbeute sollten sich vor allem auf die Optimierung des Zellaufschlusses unter Kontrolle der Kapsidqualität konzentrieren. Brown *et al.* beschreiben den Aufschluß der Zellen mit Hilfe von Ultraschall und schätzen ihre Proteinausbeuten auf ungefähr  $1 \text{ mg}/10^8$  Insektenzellen (Brown *et al.*, 1991). Auch die vereinfachte Infektion großer Zellmengen in Suspensionskultur sollte im weiteren in Betracht gezogen werden. Möglicherweise führen die optimierten Bedingungen der Spinnerkultivierung (z.B. Sauerstoffeintrag) im ungünstigsten Fall durch erhöhte Proteinüberexpression zur verstärkten Aggregationsneigung der Kapsidproteine und dadurch zu einem Kapsidausbeuteverlust.

### 4.2.1.3 Charakterisierung der rekombinanten VP2-Proteinkapside

Zur Charakterisierung der unter 4.2.1.2 aufgereinigten Partikel wurden neben biophysikalischen Eigenschaften und Morphologie auch die immunologische Reaktivität und Hämagglutinationsaktivität überprüft.

Zur Bestimmung der morphologischen Eigenschaften wurden die negativ-kontrastierten Partikel in der Transmissions-Elektronenmikroskopie beurteilt. Die VP2-Proteinkapside ähnelten in ihrer Morphologie nativen Virionen. Es handelte sich eindeutig um sphärische ikosaedrische Partikel mit einem Durchmesser von ungefähr 26 nm und Neigung zur Clusterbildung (Abbildung 17).



*Abbildung 17: Transmissions-EM von gereinigten, rekombinanten VP2-Partikeln aus Insektenzellen.*

*Negativkontrastierung mit 3 % Uranylacetat.  
Balken: 100 nm.*

Wie verschiedenen EM-Aufnahmen zu entnehmen ist, waren die nach dem oben beschriebenen Reinigungsprotokoll erhaltenen Kapsidfraktionen sehr homogen (Abbildung 18).

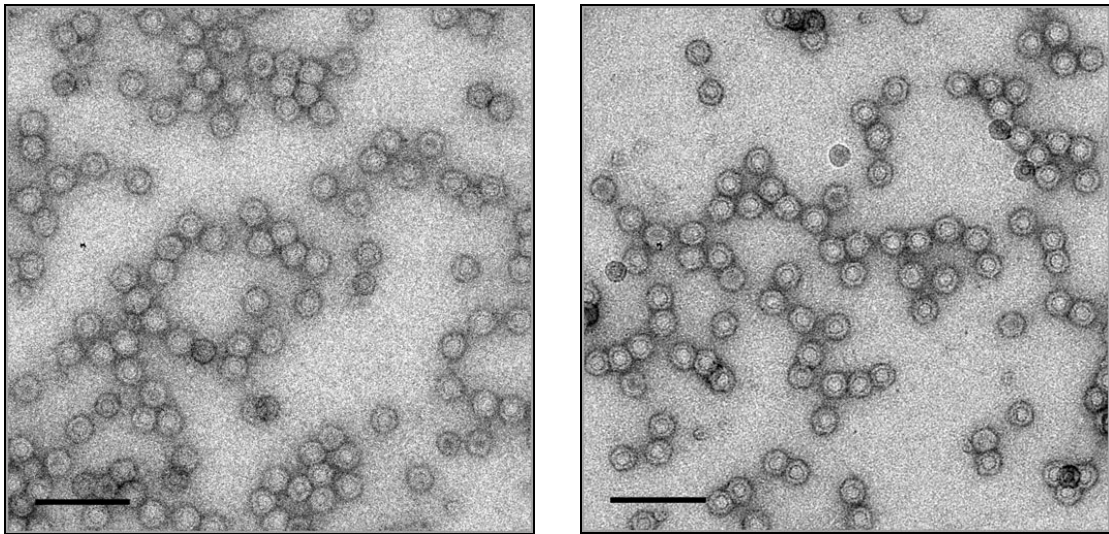


Abbildung 18: Transmissions-EM-Aufnahmen gereinigter rekombinanter VP2-Partikel. Negativkontrastierung mit 3 % Uranylacetat. Balken: 100 nm.

Die Bestimmung der Kapsiddichte erfolgte im CsCl-Dichtegradienten entsprechend dem letzten Schritt des Präparationsprotokolls. Die in der Präparation gewonnene Kapsid-Hauptfraktion hatte, wie in Abbildung 19 gezeigt, eine durchschnittliche Dichte von 1,286 g/cm<sup>3</sup>. Dieser Dichtewert entspricht dem in der Literatur für rekombinante VP2-Kapside angegebenen von 1,3 g/cm<sup>3</sup> (Kajigaya *et al.*, 1991; Koch, 1995).

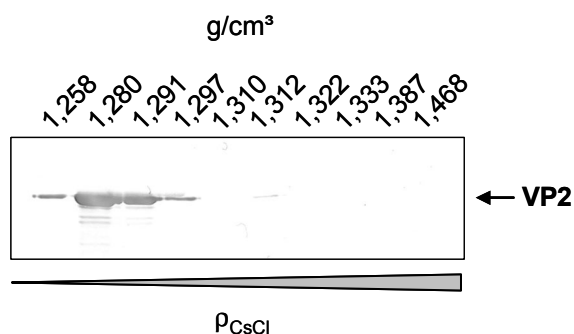


Abbildung 19: Verteilung der VP2-positiven Fraktionen im CsCl-Dichtegradienten.

Zur Dichtebestimmung wurden die einzelnen Fraktionen durch Aus-tropfen vom Boden des Zentrifugenröhrchens gewonnen und der Refraktionsindex  $n$  im Refraktometer bestimmt. Nach Pufferkorrektur wurde der Dichtewert einer CsCl-Dichtetabelle entnommen (CRC Handbook, 1999).

Diese experimentell im CsCl-Dichtegradienten ermittelte Schwimmdichte weicht signifikant vom theoretischen, aus dem spezifischen Partialvolumen des VP2-Proteins errechneten Dichtewert von 1,37 ab (Tabelle 18). Solche Unterschiede können durch Bindung weniger dichter Makromoleküle oder durch den sogenannten *excluded volume effect* bedingt sein (Arakawa &



Timasheff, 1985). Der Ausschlußvolumen-Effekt bedingt die Verdrängung voluminöser Salzionen vom Protein durch die kleineren Wassermoleküle. Die Ausbildung der Hydrathülle um das Protein resultiert in einem zusätzlichen Auftrieb der Kapside innerhalb des CsCl-Dichtegradienten.

Zur spektroskopischen Charakterisierung der VP2-Kapside wurden die Absorptions-, CD- und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen (Schmid, 1989). Abgesehen von kleinen Beiträgen der Peptidbindungen ist die Proteinabsorption im Bereich von 230 – 300 nm durch die aromatischen Aminosäure-Seitenketten von Tyrosin ( $\lambda_{\max} = 274 \text{ nm}$ ), Tryptophan ( $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ ) und Phenylalanin ( $\lambda_{\max} = 257 \text{ nm}$ ) bestimmt. Die Form und Intensität des Spektrums hängt von der Anzahl der drei aromatischen Reste im Gesamtmolekül ab. Die Proteinsequenz von VP2 enthält 21 Phenylalanine, 28 Tyrosine und 9 Tryptophane. Das Kapsid-Spektrum wird von der Absorption der Tyrosin- und Tryptophanresten dominiert und zeigt ein Maximum bei 278,98 nm. Die geneigte Basislinie zwischen 310 und 350 nm ist auf die Lichtstreuung  $L$  durch die großen Partikel zurückzuführen (Abbildung 20A). Um den Beitrag dieser Lichtstreuung zu eliminieren, wurde das Spektrum lichtstreuungskorrigiert (Latimer, 1967). Theoretische Grundlage der Korrektur ist die Rayleigh-Gleichung mit ihrer Ableitung:

$$\ln(Abs + L) = \ln(Abs + k \frac{1}{\lambda^4}).$$

Der in Abbildung 20B ermittelte Anstieg von  $-3,779$  nähert sich sehr gut dem erwarteten theoretischen Wert von  $-4$ . Die Verfälschung der Absorptionswerte durch Lichtstreuung wurde bei Vergleich des Nativspektrums mit der lichtstreuungskorrigierten Kurve sichtbar. Durch die Lichtstreuung wurde die Absorption bei 278,98 nm um circa 4 % erhöht. Dies zeigt, daß für eine korrekte spektrophotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nativer Kapside eine Lichtstreuungskorrektur durchgeführt werden sollte (Abbildung 20A). Zur Vereinfachung der spektrophotometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung in weiteren Versuchen sollte die Proteinkonzentration in Guanidiniumchlorid-denaturierten Proben bestimmt werden. Das Absorptionsspektrum aromatischer Aminosäuren hängt von der Natur der molekularen Umgebung ab. In gefalteten, nativen Proteinen sind einige der aromatischen Aminosäuren im hydrophoben Kern des Proteins verborgen. Die Exposition dieser Aminosäuren zum wässrigen Lösungsmittel während der Denaturierung verkleinert die Absorption zwischen 285 und 295 nm. Der Unterschied zwischen den Absorptionsspektren des nativen und denaturierten Proteins ist aber im allgemeinen klein. Zu beachten ist, daß auch die denaturierenden Agenzien, wie Harnstoff oder GdCl, die spektralen Eigenschaften einer Lösung verändern. Um die korrekte Bestimmung der Proteinkonzentration anhand denaturierter Kapside abzusichern, wurde das lichtstreuungskorrigierte Absorptionsspektrum mit dem Spektrum der in 6 M GdCl denaturierten Probe verglichen (Abbildung 20C).

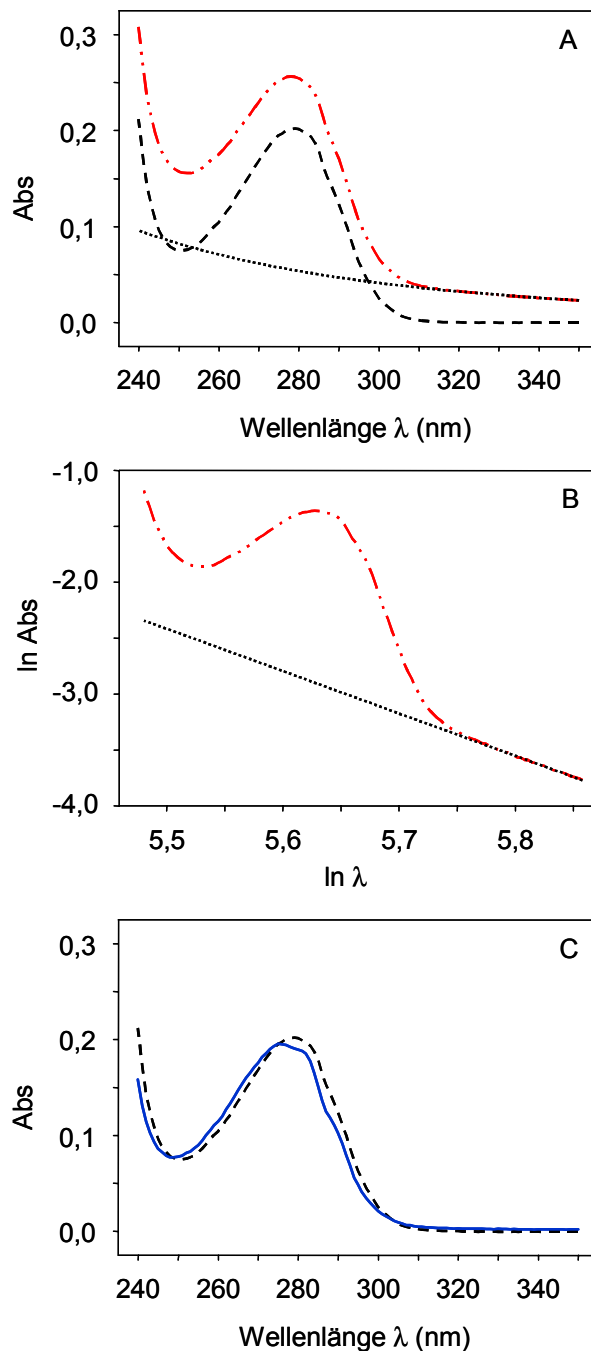


Abbildung 20: Absorptionsspektren im Bereich 240 - 350 nm.

Graph (A) Vergleich Originalspektrum und lichtstreuungs-korrigiertes Spektrum nativer rekombinanter VP2-Kapside, Darstellung des Lichtstreuungs-kurvenverlaufs, (B) Bestimmung des Lichtstreuungs-anteils aus dem logarithmisch aufgetragenen Spektrum nativer Kapside durch lineare Regression im Bereich 320 bis 350 nm ( $b[0]=18,3687$ ;  $b[1]=-3,779$ ;  $r^2=0,9977$ ) und (C) Vergleich des lichtstreuungskorrigierten Spektrums nativer rekombinanter VP2-Kapside mit dem Spektrum von in 6 M GdCl denaturierten Kapsiden.

(---) native VP2-Kapside, (.....) Lichtstreuung, (---) native VP2-Kapside, lichtstreuungskorrigiert und (—) denaturierte VP2-Kapside.

Dabei wurde eine Verschiebung des Maximums von 278,98 auf 275,05 nm und eine verstärkte Differenzierung des Spektrums beobachtet. Der Einfluß der zahlreichen Tyrosine ( $\lambda_{\text{max}} = 274 \text{ nm}$ ) auf das Spektrum wurde deutlicher. Zudem entstand eine Schulter bei 280 nm, die Tryptophan zugeordnet werden kann. Aus der Extinktion bei 280 nm der denaturierten Probe wurde unter Einbeziehung des nach der Edelhochmethode ermittelten Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (6 M GdCl) =  $87145 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  (Puffer) =  $91454,55 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für das lichtstreuungskorrigierte Spektrum nativer Kapside errechnet (Pace *et al.*, 1995). Die VP2-

Proteinkonzentration der Kapsidfraktionen wurde im weiteren in GdCl-denaturierten Proben bestimmt.

Circulardichroismus (CD) vermittelt Informationen über die ungleiche Absorption links- und rechtsdrehenden polarisierten Lichtes durch optisch aktive Moleküle. Das CD-Spektrum ermöglicht die Abschätzung des Sekundärstrukturgehaltes eines Proteins. Die CD-Signale werden in zwei spektralen Bereichen bewertet. Das Fern-UV-CD-Spektrum, die Amidregion, (170 – 250 nm) wird durch die Peptidbindungen charakterisiert, während die Signale im Nah-UV-CD-Spektrum (250 – 350 nm) von den aromatischen Aminosäureseitenketten bestimmt werden. Die Amidregion erlaubt Aussagen zur Sekundärstruktur eines Proteins. Besonders das  $\alpha$ -Helix-Motiv bewirkt ein charakteristisches CD-Spektrum. Die spektralen Anteile anderer Sekundärelemente sind weniger gut definiert.

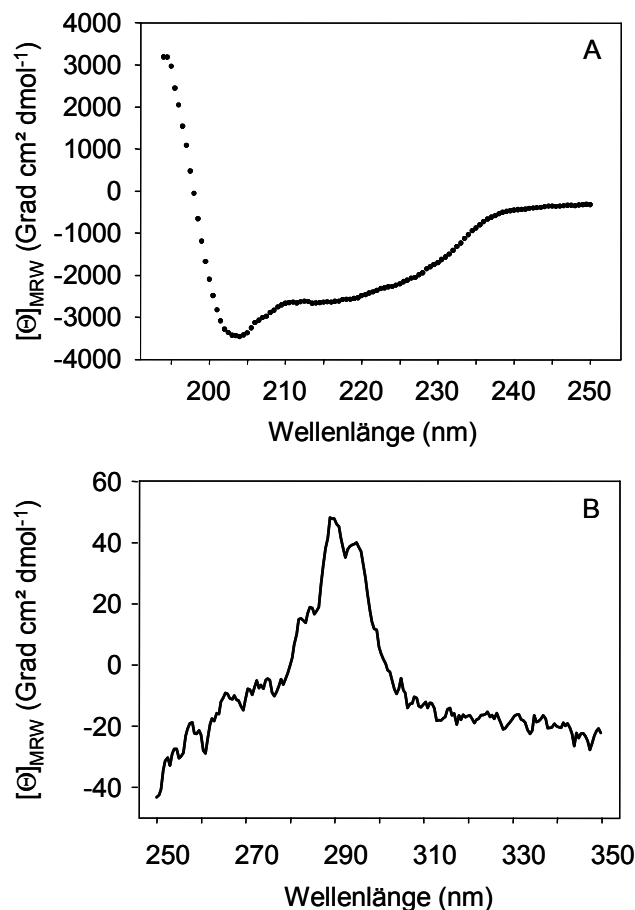


Abbildung 21: Korrigiertes UV-CD-Spektren rekombinanter VP2-Kapside.

Graph (A) Fern-UV-CD-Spektrum.  
VP2-Konzentration: 0,2 mg/ml;  
Schichtdicke: 1 mm; Akkumulation: 15  
Spektren.

Graph (B) Nah-UV-CD-Spektrum.  
VP2-Konzentration: 0,15 mg/ml;  
Schichtdicke: 10 mm; Akkumulation:  
10 Spektren.

Temperatur: 20°C; Auflösung: 0,5 nm;  
Blende: 2 nm; Span-Geschwindigkeit:  
20 nm/min.

Die CD-Daten für die VP2-Kapside wurden nach Standardmethoden auf die molare Elliptizität  $[\Theta]$  pro VP2-Monomer oder die Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{MRW}$  umgerechnet (Schmid, 1989). Das zentrale parvovirale Strukturmotiv ist ein achtsträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit großen Insertionen zwischen den einzelnen Strängen und nur geringen  $\alpha$ -helikalen Anteilen



(Brown & Young, 1997). Das Fern-UV-CD-Spektrum der VP2-Kapside bestätigt erwartungsgemäß eine Mischung verschiedener Sekundärstrukturelemente (Abbildung 21A). Die Extrema des Spektrums lassen sich keinem konkreten Sekundärstrukturelement zuordnen. Zusätzlich wird auch dieses Spektrum von Lichtstreuungsartefakten (kleine Amplitude, Rotverschiebung) beeinflusst. Die Aromaten-Signale in denaturierten Proteinen sind gleich 0. Das Nah-UV-CD-Spektrum ist daher ein hoch-sensitives Kriterium für den Nativzustand und somit der „*finger-print*“ des korrekt gefalteten Proteins. Das Nah-UV-CD-Spektrum der VP2-Kapside zeigte deutliche Signale mit zwei Maxima bei 289 und 295 nm und kann somit als charakteristische spektrale Eigenschaft zur Beurteilung des Nativzustandes von VP2 herangezogen werden (Abbildung 21B).

Fluoreszenz ist ein ausgezeichneter spektroskopischer Marker für Konformationsänderungen in Proteinen. Die Proteinfluoreszenz wird durch die aromatischen Aminosäurereste Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan mit Fluoreszenzemissionsmaxima bei 282, 303 bzw. 348 nm vermittelt. Das für VP2-Kapside ermittelte Emissionsmaximum von 332,5 nm ist typisch für Proteine, die alle aromatischen Reste enthalten. Die Fluoreszenz ist durch die Tryptophanresten dominiert, weil deren Absorption bei der Anregungswellenlänge und die Fluoreszenz-Quantenausbeute größer als die der anderen aromatischen Reste ist und die Anregungsenergie von Tyrosin und Phenylalanin sehr effizient auf Tryptophan übertragen wird (strahlungsloser Förster-Energietransfer, FRET).

Die immunologische Vergleichbarkeit der rekombinanten Partikel mit nativen Virionen wurde im direkten Kapsid-ELISA mit Antikörper gegen Parvovirus-B19-VP2-Kapsidstrukturen überprüft. Der verwendete monoklonale Antikörper 860-55D erkennt ausschließlich Konformationsepitope (Gigler *et al.*, 1999). Die rekombinanten Kapside wurden von diesem Antikörper eindeutig erkannt. Die Erkennung konnte durch Hitzedenaturierung der Kapside bei 80°C unterbunden werden. Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, daß sich die rekombinanten VP2 Partikel immunologisch nicht von nativen Viruspartikeln unterscheiden, abgesehen vom Fehlen der VP1-*unique region* und der damit verbundenen immunologischen Reaktionen. Die durch Antikörper nicht von nativen Virionen zu differenzierende Oberflächenstruktur weist damit auf einen korrekt verlaufenden Selbstassemblierungsprozeß hin.

Die in der Literatur beschriebene Hämagglutinationsaktivität der VP2-Partikel (Brown & Cohen, 1992) wurden mit einem kommerziell erhältlichen Hämagglutinationstest der Firma DIAMED getestet. Die rekombinanten VP2-Kapside hämagglutinierten erwartungsgemäß humane Erythrocyten (Abbildung 22).

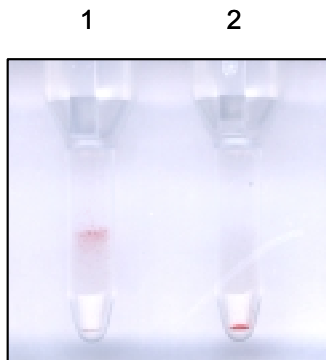


Abbildung 22: DIAMED Hämagglutinationsassay. Die Analyse beruht auf der Separierung agglutinerter und nicht-agglutinerter Erythrocyten durch Zentrifugation durch eine Gelfiltrationsmatrix. Agglutinierte Zellen bilden eine rote Linie auf der Oberfläche des Gels oder sind in der Matrix verteilt.

(1) Hämagglutination von 0,15 % humaner Erythrocyten durch 0,12 nM VP2-Kapside und  
(2) nicht-agglutinierte Zellen werden am Boden der Mikrogefäße pelletiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die in dieser Arbeit produzierten und gereinigten rekombinanten B19 VP2-Proteinkapside in ihren morphologischen und immunreaktiven Eigenschaften nicht von nativen Virionen zu unterscheiden waren und damit für *in vitro*-Analysen der Virus / Rezeptor-Wechselwirkung verwendet werden konnten.

### 4.2.2 Darstellung heterogener VP1/VP2-Kapside in Insektenzellen

Die Rolle von VP1 für die Rezeptorbindung und Strukturbildung sollte aus dem Vergleich homogener VP2- und heterogener VP1/VP2-Proteinkapside näher charakterisiert werden.

In der Literatur sind verschiedene Ansätze zur Herstellung von Mischkapsiden beschrieben. So konnte Kapsidassemblierung in CHO-Zellen 3-11-5 (Ovarzellen des Chinesischen Hamsters), die stabil die B19-Strukturproteine VP1 und VP2 (von pYT103-Sequenz) exprimieren, nachgewiesen werden. Das Expressionsverhältnis von VP2 und VP1 betrug 6:1, d.h. der VP1-Anteil war zwei- bis dreifach höher als in Proteinkapsiden von in Knochenmarkszellen replizierten B19-Virionen (10 - 20:1). Die  $^{35}\text{S}$ -markierten Kapside bandierten im CsCl-Gradienten bei  $1,31 \text{ g/cm}^3$  (Kajigaya *et al.*, 1989). Durch Coinfektion von Sf9-Insektenzellen mit rekombinanten VP1- und VP2-Baculoviren gewonnene Mischkapsidpräparationen dienten der Produktion neutralisierender Antikörper in Kaninchen (Kajigaya *et al.*, 1991). Bansal *et al.* beschreibt die Herstellung von Proteinkapsidpräparationen mit 4, 25, 35 und 41% VP1-Gehalt durch Coinfektion von Sf9-Zellen mit zwei verschiedenen Baculoviren, die VP1 oder VP2 exprimieren. Die Variation der Proteinexpression wird durch das MOI Verhältnis erreicht, z.B. wurde für das Erreichen eines 4 % VP1-Anteils in den Kapsidpräparationen eine MOI von 0,3 (VP1-Baculo) zu 3 (VP2-Baculo) eingesetzt, für 41 % 20:2 (Bansal *et al.*, 1993). Unter diesen Bedingungen, vor

allem bei einer MOI von nur 0,3, ist nicht sicher gestellt, daß alle Zellen von beiden rekombinanten Baculoviren und im angegebenen Verhältnis infiziert werden. Daher ist ein signifikanter Anteil reiner VP2-Partikel in den Kapsidpräparationen zu erwarten. Doppelinfektionen mit VP1- und VP2-rekombinanten Baculoviren sind schwer zu kontrollieren, daher wurde auch die Konstruktion eines Dual-Expressionsbaculovirus beschrieben, in dem VP1 hinter den *p10* und VP2 hinter den *polh* Promoter geschaltet wurden. Die resultierenden intakten Mischkapside hatten einen Durchmesser von 22 nm und die densitometrische Auswertung ergab ein VP2/VP1-Verhältnis von 11:1 (Brown *et al.*, 1991).

Die Vorteile des Baculosystems im Vergleich zu Säugerzellsystemen sind die einfache Zellkultivierung, die einfache Reproduzierbarkeit bei vorhandenem Virusstock und die hohe Proteinexpression. Daher sollten zur Etablierung der Herstellung von Mischkapsiden für die eigenen Arbeiten rekombinante bicistronische Baculoviren für das Insektenzell-Expressionssystem generiert werden. Die Verwendung von bicistronischen Vektoren stellt sicher, daß in jedem Fall beide Strukturproteine in der Zelle exprimiert werden. Über Einführung von Mutationen im Promoterbereich sollte das Expressionsverhältnis der Strukturproteine und in der Folge das VP2/VP1-Verhältnis in den Kapsiden reproduzierbar variiert werden. Ziel war zum einen, einen Maximalgehalt von VP1 in die Kapsidstruktur zu integrieren, um Untersuchungen zur Struktur des VP1-Proteins, insbesondere zur *unique region*, zu erleichtern und zum anderen das VP2/VP1-Verhältnis dem von nativen Virionen (19:1) vollständig anzugleichen.

### 4.2.2.1 Herstellung rekombinanter Baculoviren zur bicistronischen Expression von VP1 und VP2 in Insektenzellen

Für die Herstellung der Mischkapside wurde das für die Produktion rekombinanter VP2-Kapside etablierte Sf9/Baculo-Expressionssystem ausgewählt. Die VP1 und VP2-codierenden Sequenzen sollten auf einem Vektor in die Zellen eingeführt werden, um die parallele Transformation sicherzustellen. Das rekombinante Baculovirus Bac-duVP12 wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Bac-to-Bac® Baculovirus Expressionssystem hergestellt. In Abbildung 23 ist der Baculovirus-Herstellungsprozeß schematisch dargestellt.

Das System beruht prinzipiell auf der ortsgerichteten Transposition einer Expressionskassette von einem Donorplasmid in einen in *E.coli* DH10Bac™ propagierten Baculovirus-Shuttlevektor (Bacmid bMON14272). Das Bacmid enthält neben dem Baculovirus AcMNPV-Genom ein *low copy number* mini F Replikon für die Vermehrung in *E.coli*, eine Kanamycinresistenz zur Selektion und das Gen für das lacZα-Peptid. Das Bacmid kann daher chromosomale LacZ-Deletionen komplementieren und ermöglicht die Blau/Weiß-Selektion bacmidhaltiger *E.coli*-Klone in Anwesenheit von IPTG und X-Gal.

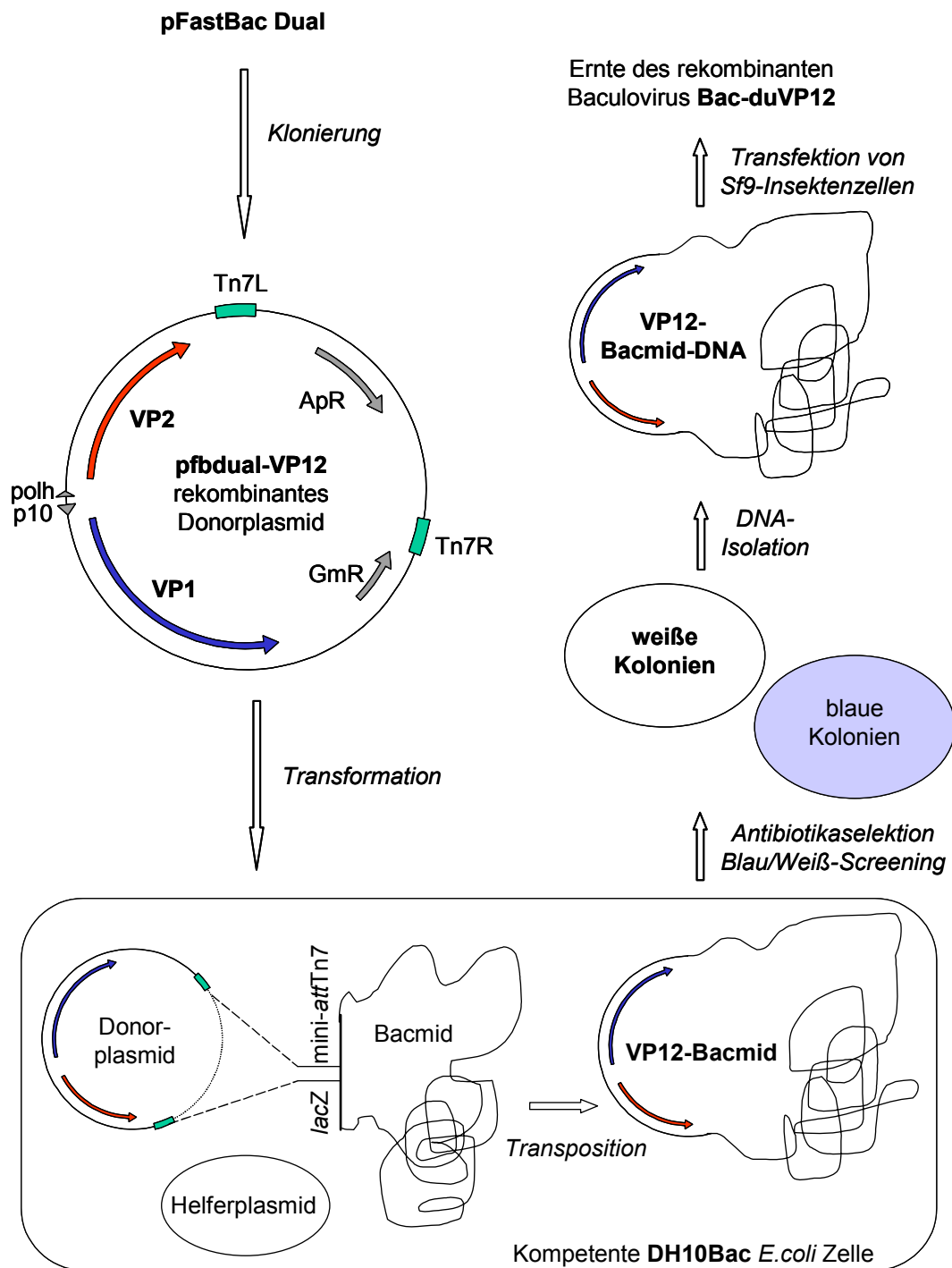


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Herstellung des rekombinanten Baculovirus Bac-duVP12.

Im 5'-Bereich des *lacZ* $\alpha$ -Peptid-Gens ist *in frame* eine *attachment-site* für das bakterielle Transposon Tn7 (*mini-attTn7*) inseriert. Rekombinante Bacmide entstehen durch Transposition

eines mini-Tn7-Elements (Expressionskassette mit gewünschter Gensequenz zur rekombinanten Proteinexpression) von einem Donorplasmid pFAST Bac in die *attachment-site* auf dem Bacmid. Die für die Transposition notwendigen enzymatischen Funktionen werden *in trans* über das Helferplasmid pMON7124 zur Verfügung gestellt. Die Transposition der Expressionskassette vom Donorplasmid in die *attachment-site* auf dem Bacmid führt zur Unterbrechung des lacZ $\alpha$ -Leserahmens. Weiße *E.coli*-Kolonien mit erfolgreich transpositionierten Bacmid-Klonen können von blauen, das Ausgangsbacmid enthaltenden *E.coli*-Kolonien im Blau/Weiß-Screening unterschieden werden. Die etwa 130 kb große rekombinante Bacmid-DNA wird aus den Bakterien isoliert und zur Transfektion der Sf9-Insektenzellen eingesetzt. Die transfizierten Insektenzellen produzieren sowohl das heterologe Protein als auch rekombinante Baculoviren, die geerntet und für Neuinfektionen eingesetzt werden können. Der Vorteil des Bac-to-Bac-Systems gegenüber herkömmlicher Baculovirus-Herstellungsmethoden liegt in der schnellen und effizienten Selektion rekombinanter Baculoviren.

In dieser Arbeit wurde das Expressionsplasmid pFastBac Dual (pfbdual), das die Klonierung von zwei Fremdgenen erlaubt, als Donorplasmid ausgewählt. Dieser Vektor enthält zwei *multi cloning sites* zur Einführung spezifischer Gensequenzen. In die MCS I inserierte Sequenzen unterliegen der Kontrolle des Polyhedrinpromoters *polh*, die innerhalb der MCS II werden vom *p10* Promoter ausgehend exprimiert. Beide Promotoren sind Baculovirus-spezifisch für die Expression in Insektenzellen und werden in der späten bis sehr späten Phase der Baculovirus-replikation aktiviert (O'Reilly *et al.*, 1992). Nach Angaben des Herstellers sollten die Promoteraktivitäten innerhalb der Expressionskassette von pfbdual annähernd gleich stark sein (persönliche Mitteilung). Das Donorplasmid codiert zusätzlich für Ampicillin- und Gentamicinresistenzen als Selektionsmarker. Entscheidend für die Funktion als Donorplasmid innerhalb des Bac-to-Bac Systems ist, daß sich die Expressionskassette innerhalb des mini-Tn7-Elementes befindet und somit bei der Transposition auf das Bacmid übertragen wird. Das Gentamicinresistenz-Gen und ein SV40-Polyadenylierungssignal sind ebenfalls innerhalb des Transpositionsbereiches lokalisiert.

**Klonierung des Donorplasmides pfbdual-VP12:** Zur Herstellung der Baculoviren mußte die Expressionskassette mit den gewünschten codierenden Sequenzen der B19 Strukturproteine beladen werden. Die Gensequenzen von VP1 und VP2 wurden, wie in Abbildung 24 schematisch dargestellt, in den Ausgangsvektor inseriert.

Die codierende Nukleinsäuresequenz des VP2-Strukturproteins wurde mittels PCR aus dem Vektor pcVP1 amplifiziert. Durch die verwendeten Primer du-VP2\_1 und du-VP2\_2 wurde am 5'-Ende des VP2-Gens eine *Xba*I-Stelle und am 3'-Ende eine Erkennungsstelle für *Hind*III inseriert. Das durch *Xba*I/*Hind*III-Spaltung des Vektors pfbdual gewonnene Vektorfragment wurde dephosphoryliert, im Agarosegel gereinigt, mit dem ebenfalls gelgereinigten, *Xba*I/*Hind*III-

geschnittenen PCR-Produkt (Insertfragment) ligiert und chemisch-kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

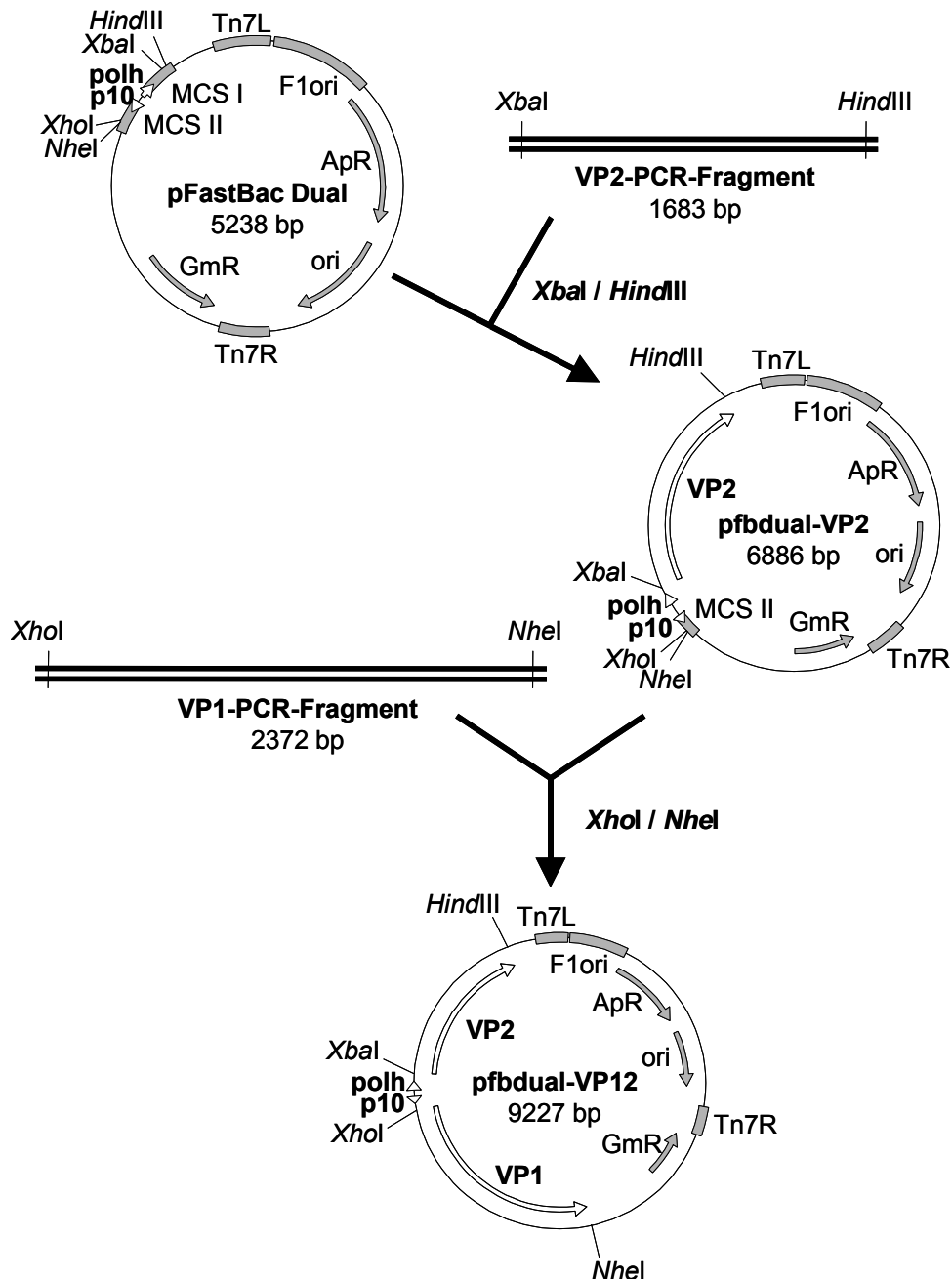


Abbildung 24: Klonierungsschema des Donorplasmides pfbdual-VP12 zur Herstellung dual-exprimierender Baculoviren.

Positive Klone wurden durch Kolonie-PCR identifiziert. Im anschließend in präparativem Maßstab gewonnenen Vektor pfbdual-VP2 befindet sich die VP2-Sequenz unter Kontrolle des Poly-

hedrinpromoters *polh*. Die Identität des Plasmids wurde mittels Testrestriktion und Sequenzierung sichergestellt. Die *Bam*HI-Testspaltung von pfbdual-VP2 ergab erwartungsgemäß zwei DNA-Fragmente (6037 und 849 bp), da mit der VP2-Sequenz eine zweite *Bam*HI-Erkennungsstelle eingeführt wurde. Der Ausgangsvektor pfbdual wurde durch *Bam*HI-Testspaltung linearisiert (5238 bp).

Pfbdual-VP2 diente als Ausgangsplasmid für die Insertion der VP1-Sequenz in die MCS II hinter den *p10*-Promoter. Das VP1 Gen wurde aus dem Vektor pcVP1 amplifiziert. Mit Hilfe der Primer du-VP1\_1 und du-VP1\_2 wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Xho*I bzw. *Nhe*I an das 5'- bzw. 3'-Ende der Sequenz eingeführt. Nach Restriktion des Vektors pfbdual-VP2 und des VP1-PCR-Produktes mit diesen Enzymen wurden das Vektor- und das Insertfragment ligiert und *E.coli* DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz transformiert. Nach Gewinnung des Vektors pfbdual-VP12 in mini-präparativen Maßstab wurde dessen Identität durch Testspaltung mit *Bam*HI bestätigt. Die *Bam*HI-Restriktion führte zu DNA-Fragmenten von 6623, 849 und 1755 bp.

**Gewinnung der rekombinanten Baculoviren:** Chemisch kompetente *E.coli* DH10Bac<sup>TM</sup> wurden mit dem neu konstruierten Donorplasmid pfbdual-VP12 transformiert und positive Klone durch wiederholtes Ausstreichen auf Selektionsmedium im Blau/Weiß-Screening identifiziert. Aus positiven rekombinanten *E.coli*-Klonen wurde die VP12-Bacmid-DNA isoliert und zur Transfektion von Sf9-Insektenzellen eingesetzt. Drei Tage nach Transfektion wurde die Sf9-Zellen durch Zentrifugation vom Medienüberstand abgetrennt. Die Expression der rekombinanten B19-Strukturproteine VP1 (83 kD) und VP2 (58 kD) konnte im WesternBlot mit  $\alpha$ -VP2 nachgewiesen werden. Der Zentrifugationsüberstand mit den rekombinanten Baculoviren BacduVP12 wurde bei 4°C gelagert und diente als Baculostock für die weiteren Expressionsexperimente.

#### 4.2.2.2 Mutation des Promoterbereichs der Expressionskassette von BacduVP12

Um das Verhältnis von VP1 und VP2 im rekombinanten Proteinkapsid gezielt zu verändern und damit die Kapsidstruktur den natürlichen Verhältnissen anzunähern, wurde das RNA-Transkriptionslevel der VP1 und VP2-Gene variiert. Dazu wurden Mutationen, die die Promoteraktivität beeinflussen können, in regulatorisch wirksame Bereiche des *polh* und *p10* Promoters der Expressionskassette von pfbdual-VP12 eingeführt und mit Hilfe der mutierten Donorplasmide wie in den vorangegangenen Versuchen Baculoviren hergestellt. Art und Position der Mutationen insbesondere bezüglich des Transkriptionsstarts sind in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

Das Expressionslevel von VP2 sollte durch die Mutation 1 im *polh* Promoterbereich, den Austausch eines Nukleinsäuredekamers 7 bis 17 Basenpaare *upstream* des mRNA Transkriptionsstarts TAAGTATT erhöht werden. Das Nukleinsäuredekamer wurde nach einer Veröffentlichung ausgewählt, in der mit dieser Mutation eine 1,5-fache Erhöhung des Transkriptionslevels des Markergens Chloramphenicol-Acetyltransferase erreicht wurde. Zum Nachweis der Promoteraktivität diente in diesen Versuchen die enzymatische Aktivität (Ooi *et al.*, 1989). Mit dem Austausch der Sequenz ATAACCATCT durch CCAAGCTTGG wurde zudem eine zusätzliche *Hind*III-Erkennungssequenz eingeführt, die die Überprüfung der Mutation mittels Testspaltung ermöglicht.

Der Transkriptionsstart innerhalb der Sequenz TAAATAAGTATT ist bei verschiedenen Baculovirus-*polh* Genen hoch konserviert und sehr ähnlich zur Sequenz am Transkriptionsstart der *p10* RNA (AAATAAGAAT). Das A der ATAAG Sequenz am *polh* RNA Initiationspunkt könnte die Promoteraktivität beeinflussen. Alle stark exprimierten RNAs werden von einer ATAAG Sequenz initiiert. Geringere Transkriptionslevel werden bei TTAAG und GTAAG Stellen initiiert. Ooi *et al.* beschreibt eine Verringerung des Transkriptionslevels um das 3-fache, wenn ATAAG gegen GTAAG innerhalb der *polh* Promotersequenz ausgetauscht wurde (Ooi *et al.*, 1989). Der *p10* Promoter ist sehr viel weniger ausführlich charakterisiert als *polh*, aber scheint bei Betrachtung der Position und Natur der Promoterdeterminanten in ähnlicher Weise reguliert zu werden (O'Reilly *et al.*, 1992). Angesichts dieser Zusammenhänge wurde zur Erniedrigung des VP1-Levels das ATAAG innerhalb der *p10* Promotersequenz von pfbdual-VP12 gegen ein GTAAG ausgetauscht. Um die Wiederholung der essentiell notwendigen Determinante TAAG zu verhindern wurden 3 Basenpaare ausgetauscht, d.h. TAAATAAG zu TTGGTAAG.

Die Mutation 1 im *polh* Promoter sollte zur Erhöhung der VP2-Expression und Mutation 2 in *p10* Promoterbereich zu einer Verringerung der VP1-Expression führen. Zu Vergleichszwecken wurden sowohl Einzelmutanten als auch eine Doppelmutante hergestellt. Sämtliche Mutationen wurden nach dem Prinzip der PCR-Mutagenese mit überlappenden Enden (Ho *et al.*, 1989) eingeführt.

Das Prinzip der PCR Mutagenese ist im Methodenteil schematisch dargestellt. Als Template-DNA für die Herstellung der einfach mutierten Plasmide diente der Vektor pfbdual-VP12. Zur Einführung der Mutationsstelle 1 im *polh* Promoter wurden in der ersten Amplifikationsrunde ein PCR-Produkt mit den Primern mut\_A und mut1\_D und ein weiteres mit den Primern mut1\_C und mut\_B gewonnen. Die PCR-Fragmente von 626 bzw. 811 bp wurden im Agarosegel aufgereinigt und in äquimolarem Maßstab als Template-DNA in einer zweiten PCR mit den Primern mut\_A und mut\_B amplifiziert.



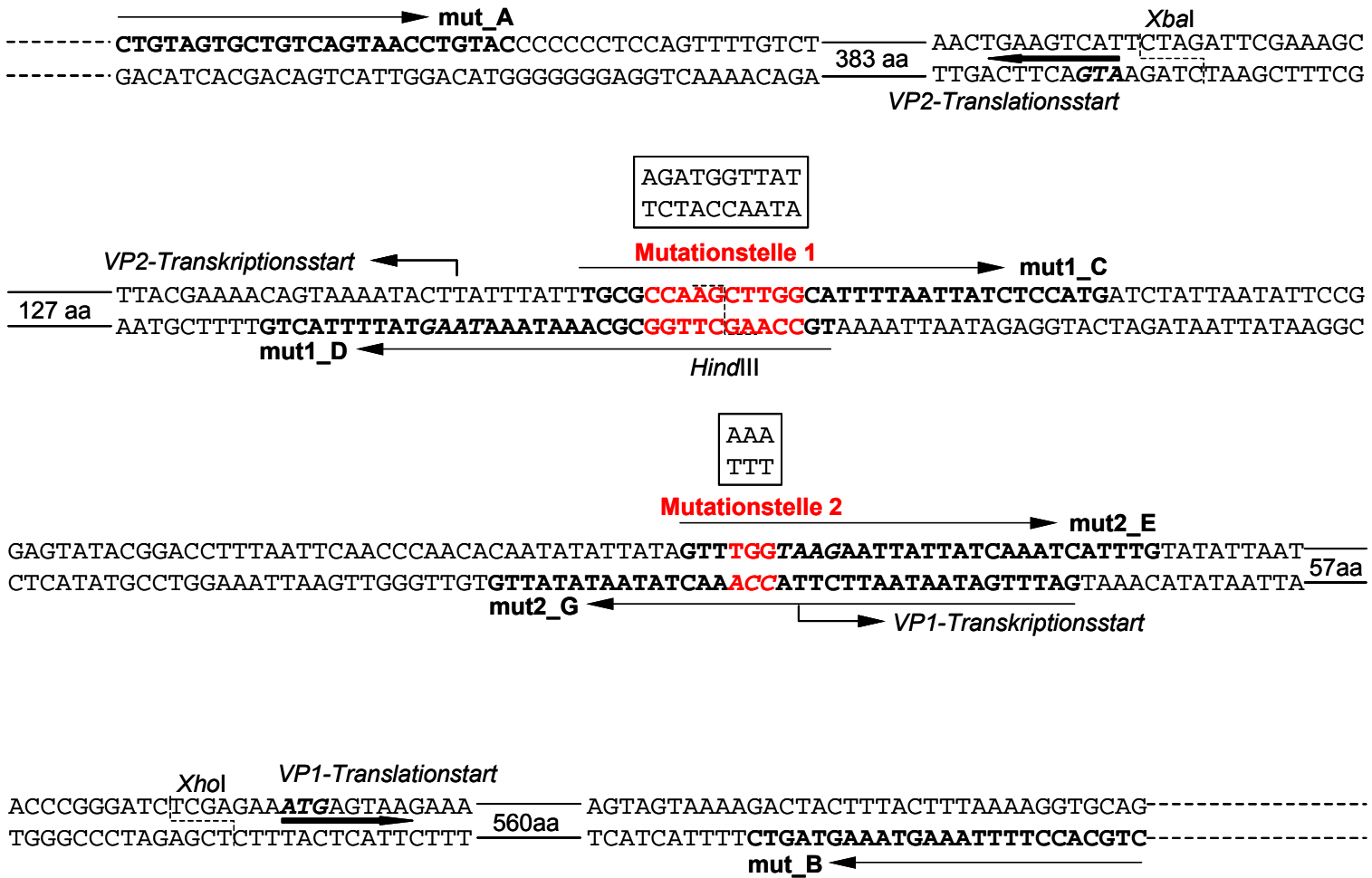


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Mutationen im Promoterbereich von *pfbdual-VP12* relativ zu Transkriptions- bzw. Translationsstart und der Position der Mutationsprimer. Die Originalsequenz an den Mutationsstellen ist in den Kästen angegeben.

Für die Einführung der 2. Mutationsstelle wurden in der ersten Amplifikationsrunde die Primer mut\_A und mut2\_G bzw. mut2\_E und mut\_B eingesetzt und die PCR-Produkte von 726 bzw. 720 bp Größe ebenfalls in äquimolarem Verhältnis als Template mit den Primern mut\_A und mut\_B in einer zweiten Amplifikationsrunde eingesetzt.

Die jeweils in der zweiten Amplifikationsrunde gewonnenen PCR-Fragmente ABmut1 und ABmut2 mit einer Größe von 1421 bp wurden wiederum gelgereinigt und der mutierte Promoterbereich (367 bp) wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Xho*I gegen die Originalsequenz im Ausgangsvektor pfbdual-VP12 ausgetauscht. Die Ligation des Insertfragmentes in einem molaren Verhältnis von 7:1 mit dem nicht-dephosphorylierten Vektorfragment erfolgte bei 16°C über Nacht. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* DH5α konnte die erfolgreiche Einführung der Mutationstelle 1 und damit die Identität des Vektors pfbdual-VP12mut1 durch Testspaltung mit HindIII und Sequenzierung nachgewiesen werden. Der Vektor pfbdual-VP12mut2 wurde durch Sequenzierung geprüft.

Für die Herstellung der Doppelmutante wurde das ABmut2-Fragment (siehe Einzelmutanten) als PCR-Template mit den Primern mut\_A und mut1\_D bzw. mit den Primern mut1\_C und mut\_B verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte dienten im Gemisch wiederum als Template für die zweite Amplifikationsrunde mit den Primern mut\_A und mut\_B. Die mutierte Region des PCR-Fragmentes ABmut12 wurden über *Xba*I und *Xho*I gegen die Region im Ausgangsvektor pfbdual-VP12 ausgetauscht. Die Sequenzgenauigkeit im Mutationsbereich von pfbdual-VP12mut12 konnte durch Sequenzierung des Promoterbereiches sichergestellt werden.

Sämtliche PCR-Produkte mußten über ein geeignetes Agarosegel aufgereinigt werden, da trotz des breiten *Screenings* der PCR-Bedingungen, d.h. trotz der Variation der  $Mg^{2+}$ -Konzentration, der *Annealing*-Temperatur, der Elongationszeit oder Template-Konzentration, in keinem Ansatz ein singuläres PCR-Produkt amplifiziert wurde. Auch die Veränderung der Position und Länge der äußeren Primer mut\_A und mut\_B führte zu keiner Verbesserung dieses Bildes. Das läßt vermuten, daß die Mutageneseprimer mut1\_C, mut1\_D, mut2\_E und mut2\_G nicht spezifisch genug waren, um nur ein PCR-Produkt zu gewinnen. Grundsätzlich werden an die Primer für die PCR-Mutagenese spezielle Anforderungen gestellt, die im Methodenteil näher aufgeführt sind. Bedingt durch die vorliegende Sequenzabfolge im zu mutierenden Promoterbereich, waren die eingesetzten Primer offensichtlich nicht optimal, führten aber unter anderem zu dem gewünschten DNA-Fragment. Die mutierten Promoterbereiche wurden durch Sequenzierung überprüft.

Die Vektoren pfbdual-VP12mut1, pfbdual-VP12mut2 und pfbdual-VP12mut12 wurden als Donorplasmide zur Herstellung rekombinanter Baculoviren im Bac-to-Bac System eingesetzt. Die durch die mutierten Baculoviren vermittelte Expression der Strukturproteine VP1 und VP2 in den transfizierten Insektenzellen wurde im WesternBlot nachgewiesen.

#### 4.2.2.3 Expression, Reinigung und Charakterisierung der VP1/VP2-Kapside

Die Expression der rekombinanten Proteine VP1 und VP2 in mit Bac-duVP12, Bac-duVP12mut1, Bac-duVP12mut2 bzw. Bac-duVP12mut12 infizierten Sf9-Insektenzellen wurde durch WesternBlot-Analyse kontrolliert. Dabei sollte auch untersucht werden, welche Auswirkungen die in den Promoterbereich inserierten Mutationen auf das Expressionslevel von VP1 und VP2 und damit auf das Verhältnis der Strukturproteine zueinander haben und ob sich das Verhältnis der rekombinanten Proteine zueinander im Zeitverlauf von 18 bis 60 h nach Virus-inokulation verändert. Dazu wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen mit Baculovirus infiziert, die Zellen zum jeweiligen Erntezeitpunkt (Dreifachbestimmung) pelletiert und gewaschen, in 100  $\mu$ l [1x] SDS-Probenpuffer aufgenommen und aufgeköcht. Wie am Beispiel von 48 h *p.i.* in Abbildung 26 gezeigt, wurde ein Aliquot des Zellysats in der SDS-PAGE aufgetrennt und die rekombinanten Proteine im WesternBlot mit dem Antikörper  $\alpha$ -VP2 (251) detektiert.

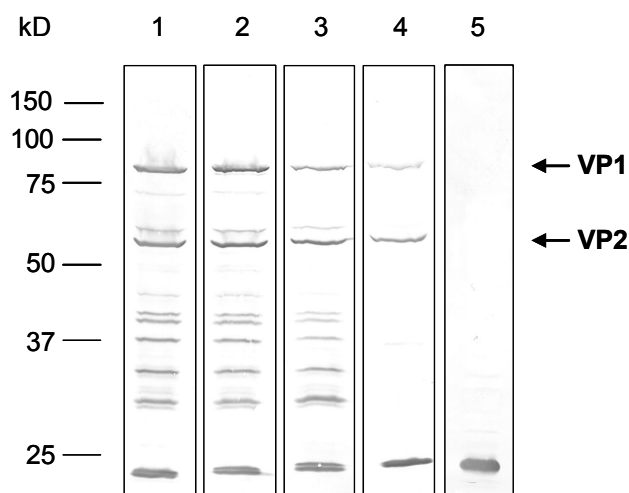


Abbildung 26: WesternBlot-Analyse von Sf9-Zellysaten 48 h *p.i.*

Spur (1) Bac-duVP12, (2) Bac-duVP12-mut1, (3) Bac-duVP12-mut2, (4) Bac-duVP12-mut12 und (5) nicht-infiziert. Auftrennung der Zellysate im 10 % SDS-PAA, Detektion im WesternBlot mit  $\alpha$ -VP2 Antiserum 251.

Die scheinbar geringere Proteinausbeute in Bac-duVP12mut12 infizierten Zellen ist auf eine geringere lysierte Zellzahl oder eine etwas geringere MOI im diesem Experiment zurückzuführen. Die Expression der heterologen Proteine konnte zu jedem der gewählten Erntezeitpunkte nachgewiesen werden. Das Verhältnis von VP1 zu VP2 wurde durch densitometrische Auswertung der WesternBlots bestimmt (Abbildung 27). Dabei konnte gezeigt werden, daß bei Infektion der Sf9-Zellen mit Bac-duVP12 VP2 und VP1 zu allen Erntezeitpunkten im Verhältnis 1:1,22 exprimiert werden. Dieses Verhältnis unterscheidet sich signifikant von dem Expressionsverhältnis 1:0,4 bei Brown *et al.*, obwohl die gleichen Promotoren verwendet wurden (Brown *et al.*, 1991). Das Transkriptionslevel der Promotoren scheint von der molekularbiologischen Struktur der Expressionskassette abhängig zu sein. Die Einführung der Mutation 1 hatte keinerlei Effekt auf das VP2/VP1-Expressionsverhältnis, die VP2-Expression konnte relativ zu VP1 nicht gesteigert werden. Dies war überraschend, da die expressionsfördernde Wirkung der Mutation im *polh* Promoterbereich für Chloramphenicol-Acetyltransferase gezeigt

werden konnte (Ooi *et al.*, 1989). Die Wirksamkeit der Mutation 1 ist offensichtlich auch durch die nachgeschaltete codierenden Nukleinsäuresequenz reguliert. Die Wirksamkeit der Mutation 2 auf den *p10* Promoter wurde bisher nicht nachgewiesen, aber aufgrund der Ähnlichkeit der Struktur von *polh* und *p10* postuliert (O'Reilly *et al.*, 1992). In dieser Arbeit konnte die signifikante Änderung des Expressionsverhältnisses VP2/VP1 auf durchschnittlich 1:0,67 unter Einfluß der Mutation 2 nachgewiesen werden. Der Expressionsanteil von VP1 konnte fast um die Hälfte verringert werden. Im Fall der Doppelmutante verbesserte sich das VP2/VP1-Expressionsverhältnis nochmals geringfügig zu Gunsten von VP2. Die Ursache dieses synergistischen Effekts ist unklar.

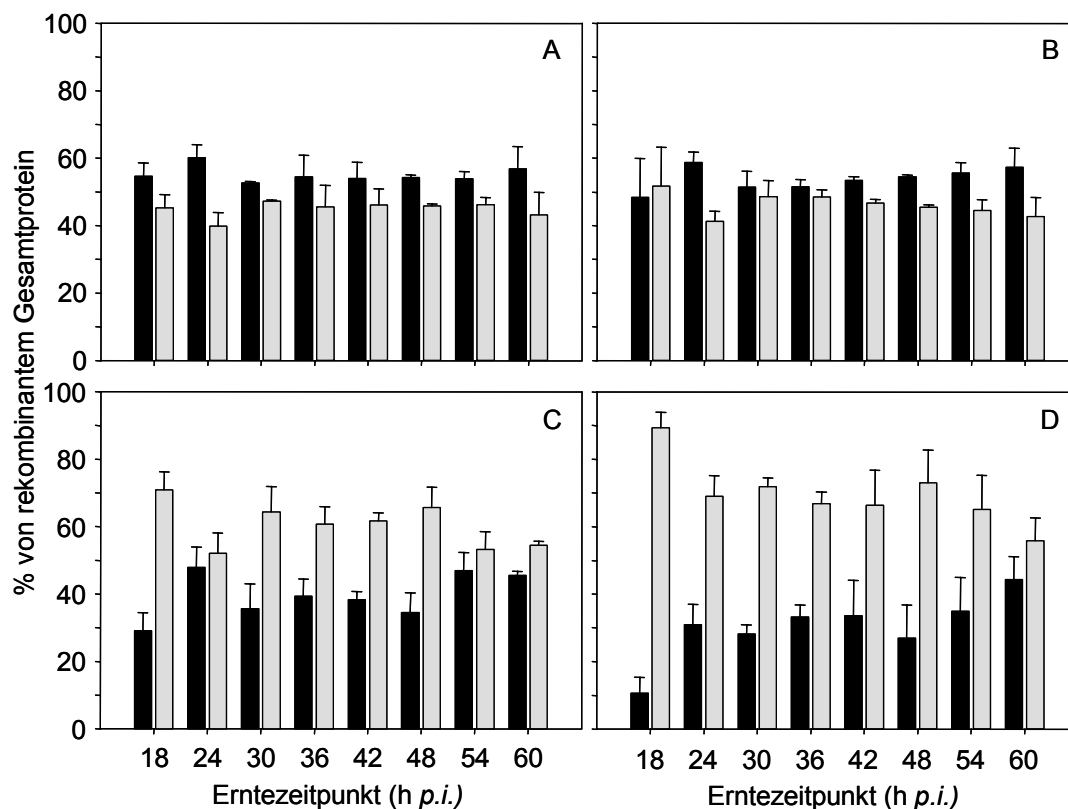


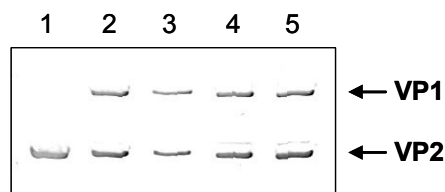
Abbildung 27: Prozentualer Anteil von VP1 und VP2 an recombinedem Gesamtprotein in Sf9-Zellysaten zu verschiedenen Erntezeitpunkten nach Infektion mit Bac-duVP12 (A), Bac-duVP12-mut1 (B), Bac-duVP12-mut2 (C) und Bac-duVP12-mut12 (Dreifachbestimmung). Densitometrische Auswertung von WesternBlot-Membranen nach Detektion mit  $\alpha$ -VP2-Antiserum 251; Schlitzblende: 2 x 0,2 mm. (■) VP1- und (▒) VP2-Protein.

Interessant ist der zeitliche Verlauf der Proteinexpression. Während das VP2/VP1-Verhältnis in Bac-duVP12 infizierten Insektenzellen weitgehend stabil bleibt, sind im Infektionsverlauf bei Bac-duVP12-mut2 und Bac-duVP12-mut12 zeitabhängige Unterschiede zu sehen. Am Beispiel der Doppelmutante ist zu erkennen, daß zwischen 24 und 54 h p.i. ein stabiles VP2/VP1-

Expressionsverhältnis von durchschnittlich 1:0,43 nachweisbar ist. Bei 60 h *p.i.* verschlechtert sich das Verhältnis relativ zu VP2 auf 1:0,82. Die deutliche Dominanz von VP2 18 h *p.i.* liegt wohl weitgehend in der allgemeinen Regulation des Baculovirus-Replikationszyklus begründet. *Polh* ist ein Promoter der späten Phase und *p10* der sehr späten Phase der Infektion. Zwischen der Aktivierung von *polh* und *p10* liegt eine geringe Zeitverzögerung (O'Reilly *et al.*, 1992), deren Auswirkung 18 h *p.i.* nur im Expressionsverhältnis der Doppelmutante angesichts der mutationsabhängig verringerten VP1-Expression sichtbar wird. Diese frühen Bereiche der Infektion sind allerdings für diese Arbeit aufgrund minimaler Proteinausbeuten und nicht nachweisbarer Partikelbildung (siehe unten) nicht von Interesse. Entscheidend könnte jedoch die Wahl des Erntezeitpunktes zwischen 48 und 60 h *p.i.* für die Herstellung von Partikeln unterschiedlicher VP1-Beladung sein. Hier unterscheidet sich das Expressionsverhältnis VP2/VP1 signifikant und das Proteinexpressionslevel ist für präparatives Arbeiten ausreichend.

Nach Sicherstellung der Proteinexpression wurden die aus der Infektion von Insektenzellen mit Bac-duVP12, Bac-duVP12-mut1, Bac-duVP12-mut2 bzw. Bac-duVP12-mut12 resultierenden Kapsidfraktionen mixVP12, mixVP12-mut1, mixVP12-mut2 bzw. mixVP12-mut12 präpariert und charakterisiert (Abbildung 28). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Vergleich von mixVP12 und mixVP12-mut12-Partikeln. Das Reinigungsprotokoll für Mischkapside orientierte sich weitgehend an dem für die VP2-Kapside etablierten. Die Ausbeuten an Kapsiden waren allerdings wesentlich geringer. Im ersten Gradienten wurden 3 Banden beobachtet. Die Wahl der Bande erfolgte nach Vergleich mit dem Sedimentationsverhalten von VP2-Kapsiden. Da im zweiten Gradienten keine opake Bande zu erkennen war, wurde die Fraktionen durch Austropfen vom Boden des Zentrifugenröhrchens gesammelt und VP2/VP1-positive Fraktionen in der SDS-Page und im WesternBlot identifiziert. Aus der Coreinigung von VP2 und VP1 kann geschlossen werden, daß VP1 in die Partikel integriert wurde. VP1 allein ist nicht in der Lage Kapside zu bilden (Kajigaya *et al.*, 1991).

Abbildung 28: Vergleich von CsCl-gereinigten Kapsidfraktionen im WesternBlot.



Spur (1) VP2-, (2) mixVP12-, (3) mixVP12-mut1-, (4) mixVP12-mut2- und (5) mixVP12-mut12-Kapside. Präparation aus Zellmaterial 60 h *p.i.*; Auftrennung im 10 % SDS-PAA-Gel; immunchemischer Nachweis mit  $\alpha$ -B19.

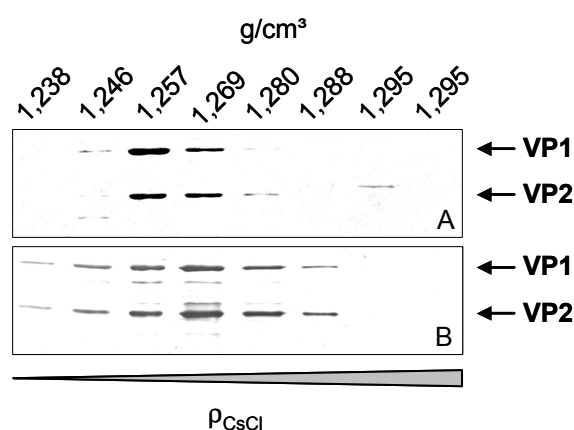
Die densitometrische Charakterisierung der Kapsidfraktion mixVP12 60 h *p.i.* ergab ein VP2/VP1-Verhältnis von 1:0,79. Dies steht im Kontrast zu den Expressionszeitverläufen, bei denen ein Überschuß von VP1 in der Zelle beobachtet wurde. Es verdeutlicht aber auch, daß die Stöchiometrie von VP1 und VP2 in nativen Virionen nicht durch den Assemblierungsprozeß

determiniert ist. Offensichtlich können in die Kapsidstruktur maximal 45 % VP1 integriert werden. Der Vergleich der VP1/VP2-Verhältnisses in den Kapsidfraktionen mixVP12 und mixVP2-mut1 zeigt erwartungsgemäß keine Unterschiede. Der VP1 Anteil in VP12-mut12-Kapsiden aus 60 h *p.i.*-Zellmaterial liegt etwas niedriger bei ungefähr 40 % (Tabelle 17). Alle Mischkapsidfraktionen wurden durch den kapsidspezifischen Antikörper 860-55D im ELISA erkannt.

*Tabelle 17: Anteil der Strukturproteine am Gesamtkapsidprotein. Densitometrische Auswertung von Abbildung 28. Schlitzblende von 2 x 0,2 mm.*

Kapsid-fraktion	VP2-	mixVP12-	mixVP12-mut1-	mixVP12-mut2-	mixVP12-mut12-
VP1	-	44,2 %	44 %	42,9 %	38,8 %
VP2	100 %	55,8 %	56 %	57,1 %	61,2 %

Die Dichte von mixVP12-Kapsiden aus Sf9-Zellen, die 60 h *p.i.* geerntet wurden, wurde im CsCl-Gradienten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß die Hauptkapsidfraktion bei einer durchschnittlichen Dichte von 1,263 g/cm<sup>3</sup> bandierte (Abbildung 29). Die Dichteabweichungen zwischen experimenteller Bestimmung im Dichtegradienten und theoretischen Wert wurden schon in Zusammenhang mit den homogenen VP2-Kapsiden diskutiert. Die gemischten Kapside sind etwas weniger dicht als die VP2-Kapside, die eine durchschnittliche Dichte von 1,286 g/cm<sup>3</sup> aufwiesen. Diese Beobachtung geht konform mit der theoretischen Dichtebestimmung für den einzelnen Proteinbaustein, abhängig von Aminosäuresequenz (Tabelle 18). Aus der theoretischen Dichtebestimmung ergibt sich eine leichte Verringerung der zu erwartenden Mischkapsiddichte im Vergleich zu VP2-Kapsiden. Diese theoretische Berechnung basierend auf der Aminosäuresequenz erklärt jedoch nur einen Dichteunterschied von 0,1 % bei einem VP1/VP2-Verhältnis von 1:1.



*Abbildung 29: Bestimmung der mixVP12-Kapsiddichte im CsCl-Dichtegradienten.*

*Aufgetragen sind die durch Austropfen gewonnenen Fraktionen 13-20. Bild (A) Coomassie-gefärbtes 12,5%iges PAA-Gel und (B) WesternBlot ( $\alpha$ -B19).*

Das heißt, daß wahrscheinlich VP1-induzierte Änderungen der Kapsidgesamtstruktur den entscheidenden Einfluß auf die Schwimmdichte der Mischkapside im CsCl-Dichtegradienten haben. Die Vergrößerung der lösungsmittelzugänglichen Proteinoberfläche durch das Vorhandensein der VP1-*unique region* ermöglicht die Vergrößerung der Hydrathülle um die Proteine und hat damit Auswirkung auf die Schwimmdichte der Mischkapside im Vergleich zu homogenen VP2-Partikeln.

*Tabelle 18: Theoretische Dichtebestimmung der Strukturproteine VP1 und VP2 über die spezifischen Partialvolumina der Aminosäuren.  $n_{AS}$  Anzahl der Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz,  $v_r$  spezifisches Partialvolumen einer Aminosäure ( $cm^3/g$ ) (Cohn & Edsall, 1943),  $av.v_r$  durchschnittliches spezifisches Partialvolumen einer Aminosäure innerhalb der Gesamtproteins,  $1/av.v_r$  theoretische Dichte des Proteins in  $g/cm^3$ .*

Aminosäure	VP1		VP2	
	$n_{AS}$	$n_{AS} \times v_r$	$n_{AS}$	$n_{AS} \times v_r$
<b><math>\Sigma</math></b>	781	571,05	554	404,27
<b><math>av.v_r</math></b>	0,731		0,730	
<b><math>1/ av.v_r</math></b>	1,368		1,370	

Zur genaueren Differenzierung der erhaltenen Kapsidfraktionen wurde dem CsCl-Kissen ein linearer Saccharosegradient angeschlossen. Zur Auftrennung wurden 200 – 500  $\mu l$  der gegen PBS dialysierten Kapsidprobe auf einen Saccharose-Stufengradienten (10 – 25 %) aufgetragen und die Kapside im Gradienten sedimentiert. In diesem System hat, neben der Dichte, die Morphologie der Partikel Einfluß auf die Fraktionierung.

Die Proteinfractionen wurden durch langsames Austropfen vom Boden des Zentrifugationsröhrchens gewonnen und mittels SDS-Gelelektrophorese und WesternBlot charakterisiert (Abbildung 30). Die Analyse von Kapsidproben mixVP12 (60 h *p.i.*), mixVP12-mut12 (24 h *p.i.*) und mixVP12-mut12 (48 h *p.i.*) zeigte, daß 24 h nach Virusinokulation keine nachweisbaren Kapsidmengen gebildet wurden. Das Sedimentationsverhalten von mixVP12 (60 h *p.i.*) und mixVP12-mut12 (48 h *p.i.*)-Kapsiden im Saccharosegradienten war sehr ähnlich. Die Hauptfraktionen bandieren in Fraktion 6, mixVP12-mut12 (48 h *p.i.*) zeigt dabei eine etwas größere Variation. Der VP1-Gehalt von 45 % in der Hauptfraktion 6 von mixVP12 bestätigt vorhergehende Experimente. Die Variation des VP1-Gehaltes in den anderen Fraktionen ist gering (mindestens 30% VP1-Gehalt). Die VP1-Menge in den Hauptfraktionen 5 und 6 der mixVP12-mut12-Kapsidpräparation (48 h *p.i.*) beträgt durchschnittlich 30 %. Das entspricht dem VP2/VP1-Expressionsverhältnisses (ungefähr 70% zu 30%) zu diesem Infektionszeitpunkt.

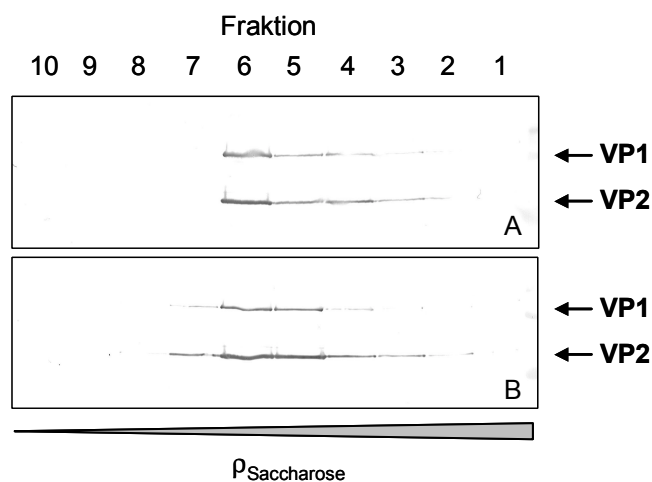


Abbildung 30: Fraktionierung von Mischkapsidproben durch Sedimentation in einen Saccharosegradienten.

Bild (A) mixVP12 (60 h p.i.) und (B) mixVP12-mut12 (48 h p.i.). WesternBlot-Analyse ( $\alpha$ -B19).

Die Fraktionen 6 aus den Saccharosegradienten wurden in der EM mit VP2-Kapsiden verglichen. Dabei wurden weder zwischen den Mischkapsidpräparationen (Partikeldurchmesser circa 26 nm) noch im Vergleich zu den VP2-Kapsiden morphologischen Unterschiede sichtbar. VP1 hat keinen erkennbaren Einfluß auf Größe und Form der Partikel.

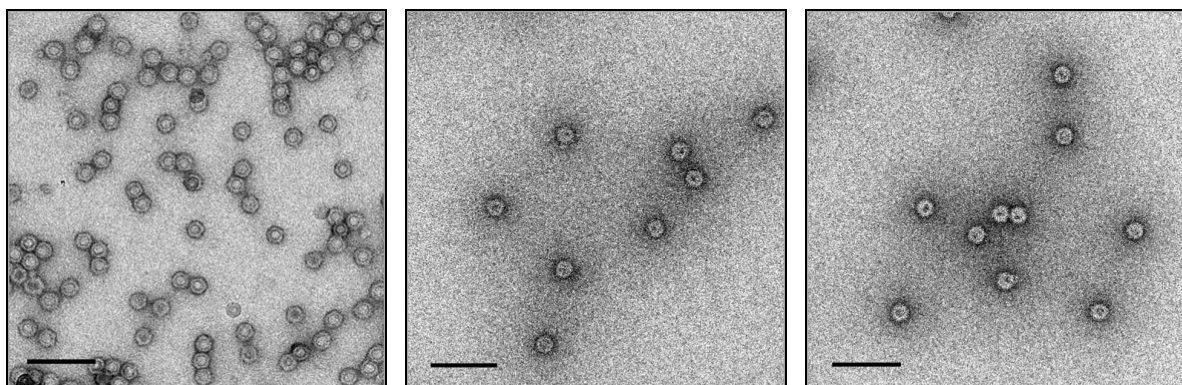


Abbildung 31: Elektronenmikroskopischer Vergleich rekombinanter Kapside aus Bac-VP2, Bac-VP12 und Bac-VP12-mut12 infizierten Insektenzellen (von links nach rechts). Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Balken: 100 nm.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit konstruierten Baculoviren Bac-duVP12 und Bac-duVP12-mut12 konnten Mischkapside mit VP1-Anteilen von 45 bzw. 30 % hergestellt werden. Diese Verhältnisse liegen deutlich über dem von Brown *et al.* beschriebenen Anteil von 8,3 % (Brown *et al.*, 1991). Die verwendeten Mutationen konnten das Expressionsverhältnis der Strukturproteine VP1 und VP2 nicht ausreichend verändern, um das Proteinverhältnis den nativen Virionen anzugleichen. Grundsätzlich ist ein solcher Mutageneseansatz im Dual-Expressionssystem aber für die Herstellung von Kapsiden unterschiedlichen VP1-Gehaltes geeignet. Der Vorteil des Systems beruht auf der sichergestellten Cotransfektion der Insektenzellen und damit stabilen Expres-



sionsverhältnissen von VP1 zu VP2 in allen transfizierten Zellen. Die Variation des Expressionsverhältnisses ist damit durch den Vektor und nicht durch Infektionswahrscheinlichkeiten determiniert.

Die erhaltenen heterogenen Kapside konnten im weiteren als Vergleich für Bindungsstudien und Rezeptorscreening-Experimente verwendet werden. Die VP1/VP2-Kapside können zudem für Experimente zur Klärung der Rolle und Struktur der VP1-*unique region* herangezogen werden. Insbesondere der 10-fach höhere VP1-Gehalt im Vergleich zu nativen Virionen erlaubt eingehende strukturelle Untersuchungen.

#### **4.2.3 Vortests zur *in vitro*-Assemblierung von VP2-Kapsiden**

Im preiswerten und ausbeutereichen *E.coli*-Expressionssystem konnte bislang keine B19-Kapsidassemblierung beobachtet werden, die Kapsidproteine aggregieren in den Bakterienzellen in unlöslicher Form (Rayment *et al.*, 1990). Um Kapside im präparativen Maßstab bakterieller Expressionssysteme zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit Vorversuche zur *in vitro*-Assemblierung von VP2-Kapsiden durchgeführt. Das Proteinkapsid kann aus nur einer Spezies von Strukturuntereinheiten, dem VP2-Protein gebildet werden und stellt somit ein einfaches System zur Untersuchung von Kapsid-Assemblierungsmechanismen dar. Ein geeignetes *in vitro*-Assemblierungsprotokoll würde zudem die Möglichkeit eröffnen, chimäre VP1/VP2-Partikel jedes gewünschten Mischverhältnisses in präparativen Maßstab zu produzieren.

##### **4.2.3.1 Konstruktion von Expressionsvektoren zur VP1- und VP2-Produktion in *E.coli***

Voraussetzung für Assemblierungsversuche ist die Herstellung geeigneter *E.coli*-Expressionsvektoren zur Anreicherung und Reinigung rekombinanten Proteins aus Bakterien. Das pET-Expressionssystem ermöglicht sehr hohe Proteinausbeuten, schon wenige Stunden nach Induktion kann das gewünschte heterologe Protein mehr als 50 % des gesamten Zellproteins umfassen. Die Zielgene befinden sich unter Kontrolle eines starken IPTG-induzierbaren Bakteriophagen T7 Promoters und die Expression ist abhängig von der T7 RNA Polymerase, die von der Wirtszelle bereitgestellt werden muß. Wie in Abbildung 32 schematisch dargestellt, wurden die codierenden Sequenzen der B19 Strukturproteine VP1 und VP2 über die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *NdeI* in die *multiple cloning site* des Vektors pET11a eingeführt. Die VP1 bzw. VP2-Sequenz wurde dazu mit den Primern TYB-VP2\_1 und du-VP1\_2 bzw. TYB-VP1 und du-VP1\_2 aus dem Vektor pcVP1 amplifiziert. Die amplifizierten Sequenzen wurden gereinigt und *Asel/NheI* geschnitten. Die aus der *Asel*-Restriktion resultierenden überhängenden Enden sind kompatibel zu *NdeI*-Schnittstellen. Der Vektorfragment wurde durch Restriktion mit *NheI/NdeI* aus dem Ausgangsvektor pET11a gewonnen und dephosphoryliert. Nach Liga-

tion und Transformation in kompetente *E.coli* DH5 $\alpha$  wurde die pET11a-VP1 bzw. pET11a-VP2-DNA aus den Bakterien präpariert und die Identität der konstruierten Vektoren mittels Testspaltung mit *EcoRI/XbaI* (pET11a-VP2: 5278 und 2064 bp; pET11a-VP1: 5278 und 2745 bp) und Sequenzierung bestätigt.

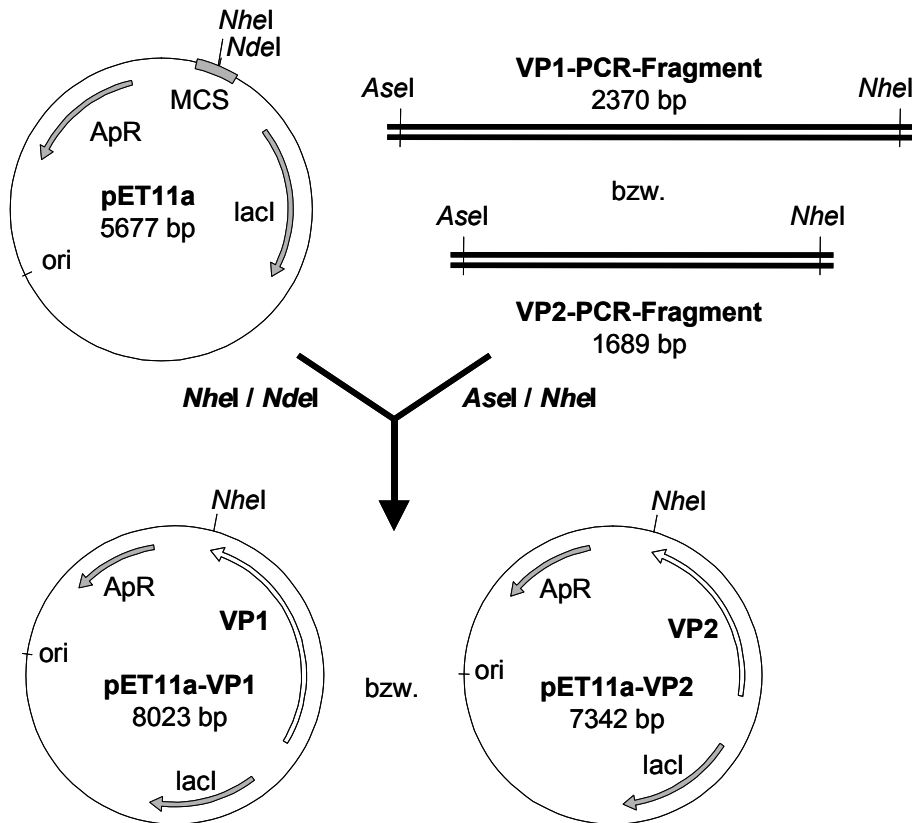


Abbildung 32: Konstruktionsschema zu den Vektoren pET11a-VP1 und pET11a-VP2.

Nach Transformation der Plasmide in kompetente *E.coli* BL21 wurde die Expression der rekombinanten Proteine im SDS-Gel nachgewiesen (Abbildung 33). Die detaillierte Untersuchung zur Lokalisation des rekombinanten Proteins in Aufschlußpräparaten zeigte, daß sowohl das VP1 als auch das VP2 in der Zelle in unlöslichen Aggregaten (sogenannten *Inclusion bodies*) akkumulierte.

Mit dem pET11a-System konnte eine hohe VP1 und VP2-Proteinausbeute erreicht werden (circa 0,6 g VP2-Protein aus 1 l *E.coli*-Kultur). Das rekombinante Protein aggregierte aber vollständig in unlöslicher Form.

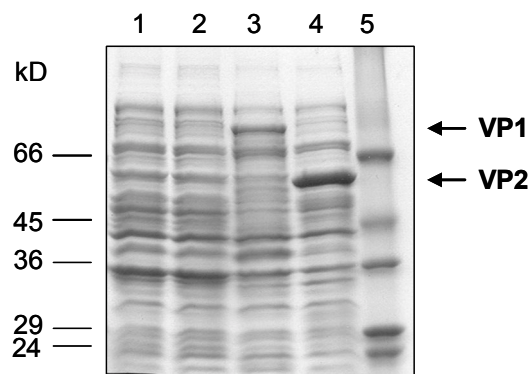


Abbildung 33: Kontrolle der Proteinexpression in *E.coli* BL21.

Spur (1) *pET11a-VP1*, nicht-induziert, (2) *pET11a-VP2*, nicht-induziert, (3) *pET11a-VP1*, IPTG-induziert, (4) *pET11a-VP2*, IPTG-induziert und (5) LMW. Coomassie-gefärbtes 10 % PAA.

Zur Gewinnung löslichen Ausgangsmaterials für die *in vitro*-Assemblierung von Kapsiden wurde daher ein zweites Expressionssystem nach einem Intein-Fusionsprotokoll in Angriff genommen. Die heterologe Expression als Fusionsprotein kann die Löslichkeit eines Proteins erhöhen. So konnte ein lösliches Fusionsprotein aus einem circa 37 kD B19-Strukturproteinfragment und Protein A hergestellt werden (Morinet *et al.*, 1989). Mit den IMPACT System wurden bei eukaryotischen Proteinen zudem häufig niedrige Expressionsraten mit Ausbeuten zwischen 0,5 – 1 mg/l *E.coli*-Kultur beobachtet. Es wird vermutet, daß aufgrund der kinetischen Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation eine massive Überexpression die Ausbildung unlöslicher Aggregate begünstigt (Kiefhaber *et al.*, 1991). Ausschlaggebend für die Wahl des Intein-systems war neben der Verfügbarkeit im eigenen Labor auch das einfache Reinigungsprinzip bei 4°C, d.h. die Präparation erfolgt ohne Proteolyseschritte bei höheren Temperaturen, die die Stabilität des Zielproteins beeinflussen könnten. Es wurde gezeigt, daß das System für die Reinigung von Polyomaviruskapsomeren geeignet ist (Schmidt, 2000).

Das IMPACT™ T7 Proteinreinigungssystem ermöglicht die Intein-vermittelte Reinigung rekombinanten Proteins mit einer chitinbindenden Domäne in nur einem Affinitätschromatographieschritt. Das Zielprotein wird in seiner nativen Sequenz ohne zusätzliche Aminosäuren an den Enden gewonnen. Die Methode beruht auf einem Protein-Spleißelement, dem Intein, aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das Intein wurde so verändert, daß es in Gegenwart von DTT oder anderen Thiolen bei niedrigen Temperaturen eine Selbstspleißreaktion an seinem N-Terminus durchführt. Zur Herstellung des Zielprotein-Intein-Fusionskonstruktes wird das Zielgen *in-frame* in die MCS *upstream* der für das Intein codierenden Sequenz in den Vektor pTYB1 inseriert. Am 3'-Ende der Inteinsequenz befindet sich zusätzlich die DNA für eine 5 kD große Chitinbindedomäne (CBD) aus *Bacillus circulans*. Dieser dritte Teil des Fusionsproteins ermöglicht die Reinigung des Proteins über eine Chitinsäule. Die Expression des fusionierten Genkonstruktes ist unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7 Promotors und abhängig von der *in*

*trans* Expression der T7 RNA Polymerase in einem geeigneten *E.coli*-Stamm. Zusätzlich trägt der Vektor pTYB1 eine Ampicillinresistenz zur Selektion.

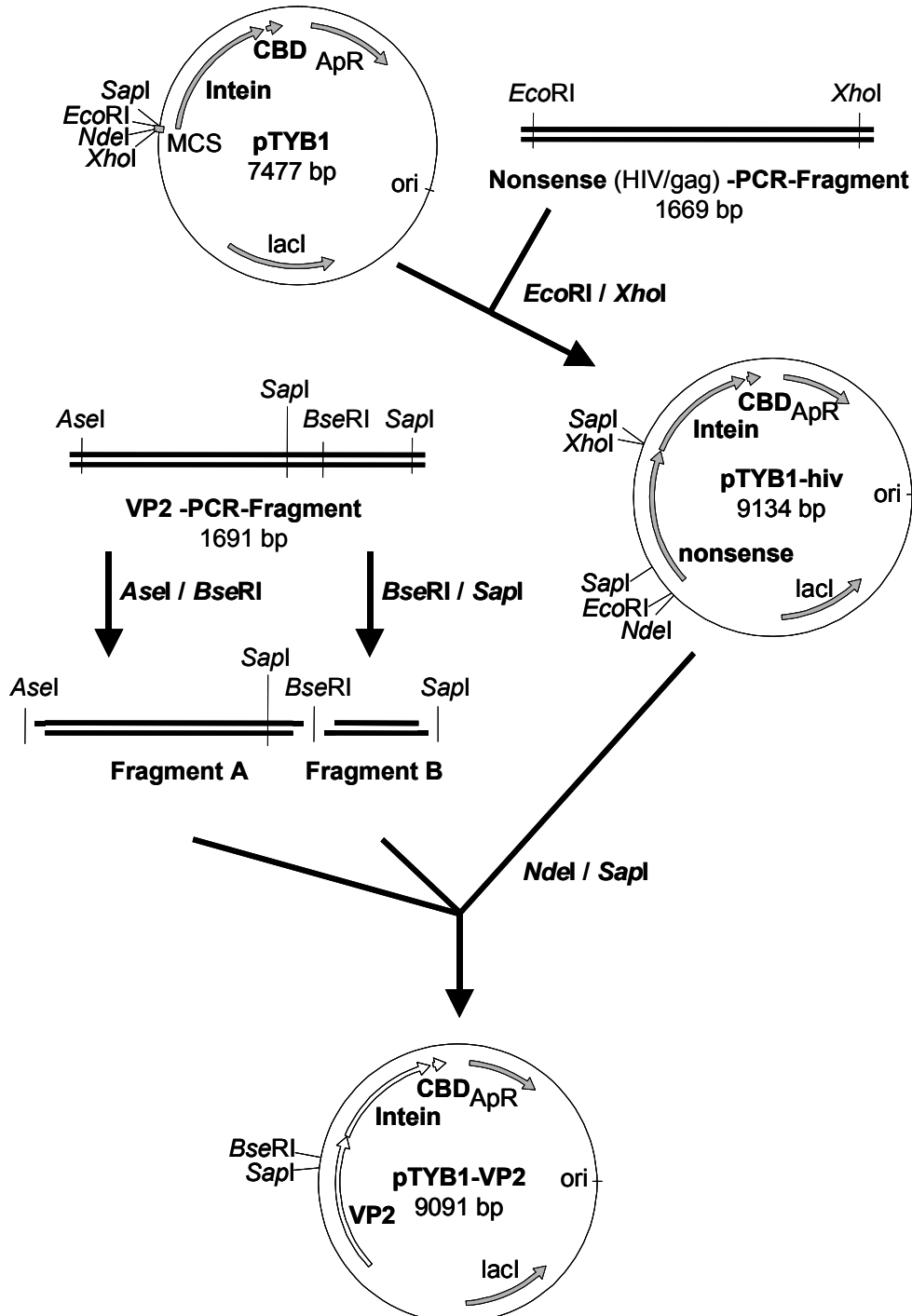


Abbildung 34: Klonierungsschema zur Herstellung des Expressionsplasmids pTYB1-VP2.

Die Klonierungsstrategie für pTYB1-VP2 ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt. Die am 5'-Ende der MCS gelegene *NdeI*-Schnittstelle enthält eine ATG Sequenz zur Initiation der Translation. Die Nutzung der *SapI*-Schnittstelle erlaubt die Klonierung des Zielproteins unmittelbar an das Intein. Die Nutzung der Restriktionsstelle *SapI* für die Insertion des VP2-Gens ist notwendig, um nach Abspaltung der Inteinsequenz keine zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus der VP2-Originalsequenz zu erhalten. Da auch innerhalb der VP2-codierenden Sequenz eine *SapI*-Schnittstelle zu finden ist, mußte die pTYB1-VP2 Vektorkonstruktion mittels einer Drei-Fragment-Klonierung erfolgen.

Eine Voraussetzung für eine solche Ligation ist ein vollständig geschnittenes Vektorfragment. Daher wurde in die MCS des Originalvektors pTYB1 eine „*non-sense*“ Sequenz eingeführt, die es ermöglicht bei der Gewinnung des Vektorfragmentes durch Restriktion mit *NdeI* und *SapI* genau zwischen einfach-geschnittenen und korrekt geschnittenen Restriktionsprodukten zu unterscheiden. Die „*non-sense*“-Sequenz wurde durch *EcoRI* / *XhoI*-Restriktion aus einem Vektor gewonnen, der die gesamte HIV-gag-Sequenz enthält und über diese Schnittstellen in den Vektor TYB1 eingeführt. Nach Transformation in chemisch kompetente *E.coli* SURE und Testspaltung wurde der Vektor pTYB1-hiv in größerer Menge präpariert und diente als Ausgangsplasmid für die Herstellung von pTYB1-VP2.

Die VP2-Sequenz wurde über PCR mit den Primern TYB-VP2\_1 und TYB-VP2\_2 aus dem Plasmid pUC18-VP1 amplifiziert. Entsprechend der Aminosäuresequenz von VP2 wurde an Position –1 direkt upstream des N-terminalen Cysteins des Inteins (Spaltstelle) ein Leucinrest positioniert. Nach Angaben des Herstellers bewirkt ein Glycinrest in dieser Position eine deutliche Steigerung der Effizienz der DTT-induzierten Spaltung. Da ein zusätzlicher C-terminaler Glycinrest wahrscheinlich wenig Auswirkung auf die Faltungsmechanismen hat, wurden parallel die Primer TYB-VP2\_1 und TYB-VP2gly für die Amplifikation verwendet. Mit dem Primer TYB-VP2gly wurde am 3'-Ende des VP2-Gens ein Glycin-Codon eingeführt. Das jeweilige, ungefähr 1700 bp große PCR-Produkt wurde aufgereinigt und die VP2-Restriktionsfragmente A und B durch Spaltung mit *Asel/BseRI* bzw. durch Spaltung *SapI/BseRI* gewonnen. Das Restriktionsfragment B läßt sich im 2 %-igen Agarosegel sauber von einem möglichen nur *SapI*-geschnittenen, aber 108 bp größerem Fragment abtrennen. Die Klonierungsstrategie unter Nutzung der *BseRI*-Schnittstelle hat den Vorteil das die folgende 3-Fragment-Ligation nur Vektorprodukte in richtiger Orientierung ergeben kann. Die gelgereinigten Fragmente A (1353 bp) und B (313 bp) wurden mit dem *NdeI/SapI*-geschnittenen und ebenfalls gelgereinigten Vektorfragment in einem molaren Verhältnis von 5:2:1 über Nacht bei 16°C ligiert und der Ligationsansatz in kompetente *E.coli* SURE transformiert. Die aus *E.coli*-Klonen gewonnene Plasmid-DNA wurde durch *HindIII/XbaI*-Testspaltung charakterisiert. Die Identität wurde durch zwei spezifische Restriktionsfragmente von 6733 und 2161 bp Größe (pTYB1-VP2) und Sequenzierung bestätigt.

Die Vektoren pTYB1-VP2 und pTYB1-VP2gly wurden in den Expressionsstamm ER2566 eingeführt. Zur Expressionskontrolle wurden die Bakterienstämme ER2566 pTYB1-VP2 und ER2566 pTYB1-VP2gly 4 h Induktion mit IPTG induziert. Nach der Ernte wurden die Zellen 3 x 30 sec mit Ultraschall (80W) behandelt und das Lysat 30 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugationspellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit dem löslichen Überstand auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 35). Die Analyse zeigte, dass sich das rekombinante Proteinkonstrukt VP2/Intein/CBD mit einer Gesamtgröße von 113 kD (58/50/5 kD) vollständig im Zentrifugationspellet angesammelt hatte, d.h. daß sich das VP2-Protein in den Zellen in großen Aggregaten (*Inclusion bodies*) angesammelt hat, und nicht oder nur in geringem Maße in löslicher, nativer Form in den *E.coli*-Zellen zu finden ist.

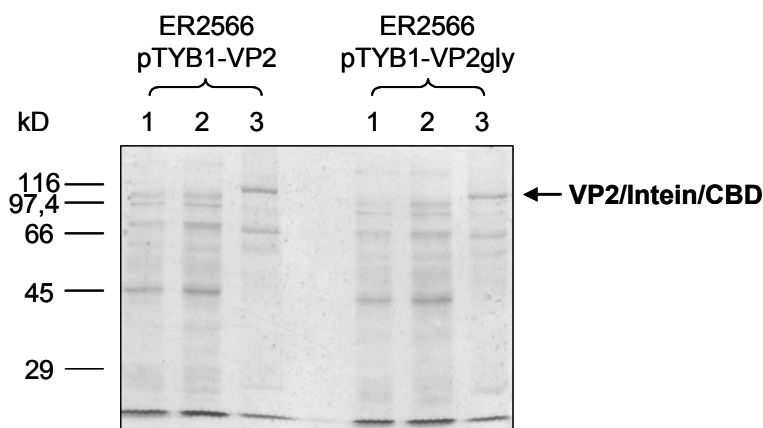


Abbildung 35: Kontrolle der Proteinexpression in *E.coli* ER2566 pTYB1-VP2 und pTYB1-VP2gly.

Spur (1) nicht-induziert, (2) Überstand, IPTG-induziert und (3) Pellet, IPTG-induziert. Induktion 3 h, 2 mM IPTG; Coomassiegefärbtes 10 % SDS-PAA-Gel.

Das Ziel der Verwendung des Inteinsystems war die Gewinnung großer Mengen löslichen VP2-Proteins durch Expression als Fusionsprotein. Dieses Ziel konnte mit dieser Methode nicht erreicht werden. Ein solches Ergebnis war jedoch nicht völlig überraschend, da auch für ein 196 kD Fusionsprotein aus  $\beta$ -Galactosidase und dem C-terminal um 51 Aminosäuren verkürzten VP1-Protein Solubilitätsprobleme beschrieben wurden (Schwarz *et al.*, 1991). Da die Expressionsmengen des unlöslichen Inteinfusionsproteins deutlich unter denen des pET11a-Systems lagen, wurde vorerst die Expression der B19-Strukturproteine über pET11a und die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen zur Materialgewinnung für *in vitro*-Assemblierungsversuche gewählt.

### 4.2.3.2 Expression und Reinigung von rekombinantem VP2 und erste *in vitro*-Assemblierungsstudien

Die Bildung unlöslicher, inaktiver Proteinaggregate in den Wirtszellen bei Produktion rekombinanter Proteine in Mikroorganismen ist ein häufiges Phänomen. Allerdings bieten diese Aggre-

gate die Möglichkeit zur schnellen und einfachen Anreicherung des gewünschten Proteins. Um die Cosedimentation von Zelltrümmern zu vermeiden, sollten die Bakterienzellen vor der Zentrifugation maximal lysiert sein. Dies wurde durch Hochdruckdispersion in der French Press und solubilisierende Agenzien im Puffer (0,5 M NaCl und 2 % Triton X-100) unterstützt (Buchner & Rudolph, 1991). Durch Zentrifugation und mehrere Waschschriffe mit NaCl/Triton X-100-haltigem Puffer wurde das rekombinante Protein in den *Inclusion bodies* stark angereichert. Die *Inclusion bodies* enthielten verschiedene *E.coli*-Proteine zusätzlich zum rekombinanten VP1 bzw. VP2 Protein, das circa 60 % des gesamten *Inclusion body*-Proteins ausmachte. Die Faltung eines Zielproteins wird normalerweise nicht durch andere in der Lösung renaturierende Proteine beeinflusst (Jaenicke *et al.*, 1981), daher kann die effiziente Abtrennung von Fremdproteinverunreinigungen auch nach der Renaturierung und *in vitro*-Assemblierung der Kapside, z.B. durch Sedimentation im CsCl-Kissen oder Gelfiltration erfolgen.

Die Solubilisierung der angereicherten Proteinaggregate erfolgte mit Guanidiniumchlorid (GdCl). GdCl ist ein sehr starkes Chaotrop, das auch sehr stabile *Inclusion bodies* auflösen kann. Zudem wird die chemischen Modifizierung der Aminogruppen von Lysinseitenketten (durch Isocyanat in Harnstofflösungen) umgangen. Da VP1 und VP2 cysteinhaltige Proteine sind, erfolgte die Solubilisierung in Gegenwart von 0,1 – 0,3 M Dithioerythritol (DTE), um die Reduktion von Disulfidbrücken zwischen des aggregierten Polypeptidbrücken zu reduzieren. Zur Erhaltung der reaktiven Thiolatanionen wurde die Solubilisierung bei leicht alkalischem pH von 8,5 durchgeführt. Die Zugabe von EDTA zum Solubilisierungspuffer diente der Komplexbildung von Metallionen, die unerwünschte Oxidationsreaktionen der Cysteinreste mit molekularem Sauerstoff katalysieren. Zur Bestimmung des Solubilisierungsüberganges wurde Solubilisierungspuffer mit 0, 1, 2, 3, 4, und 6 M GdCl hergestellt. Circa 5 mg *Inclusion body*-Protein wurde in 1 ml des 0 M GdCl-Puffers resuspendiert, 30 min bei RT gerührt und bei 30000xg (20 min, 4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde im nächsthöher konzentrierten GdCl-Solubilisierungspuffer aufgenommen, wiederum 30 min bei RT gerührt, abzentrifugiert und der Vorgang bis zum 6 M GdCl-Puffer wiederholt. Aliquots der Solubilisierungsüberstände wurden gegen Tris/HCl (pH 8,5; 2 mM EDTA) dialysiert und nach Aufnahme in Probenverdünnungspuffer mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 36).

Eine Abschätzung der Proteinmengen war anhand dieser Gele nicht möglich, da während der Dialyse in einigen Proben die Aggregation von Protein beobachtet werden konnte. Der Solubilisierungsübergang der VP2- und VP1-*Inclusion Bodies* lag jeweils zwischen 3 und 4 M GdCl. Geringe VP1-Mengen konnten sogar bei 2 M GdCl solubilisiert werden. Für die nachfolgenden Renaturierungsversuche von VP2 wurde das *Inclusion body*-Protein in 6 M GdCl zu einer Endkonzentration von circa 2 mg/ml solubilisiert.

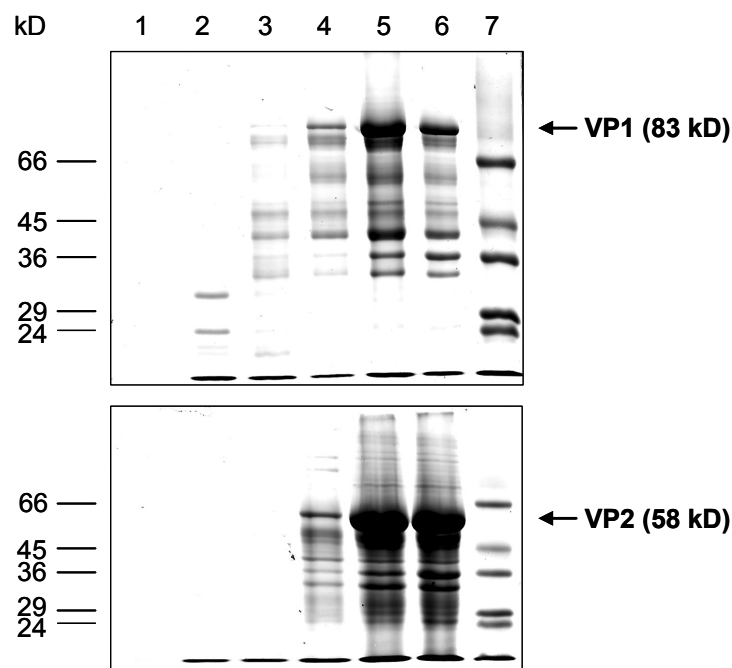


Abbildung 36: Solubilisierungsübergang von VP1- und VP2-Inclusion bodies bei Behandlung mit variierenden Konzentrationen GdCl.

Spur (1) 0 M, (2) 1 M, (3) 2 M, (4) 3 M, (5) 4 M, (6) 6 M GdCl und (7) LMW. Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-PAA-Gel.

Zur Renaturierung kann das Denaturierungsmittel GdCl durch sequentielle Dialyse oder Verdünnung aus der Proteinprobe entfernt werden. Die Dialyse gegen Puffer bietet den Vorteil, daß die Renaturierung mit hohen Proteinkonzentrationen langsam erfolgt. Dabei wird das Protein allerdings über längere Zeit schwach denaturierenden Bedingungen ausgesetzt, was bei einigen Proteinen zur Präzipitation aggregationsempfindlicher Faltungsintermediate führen kann. Nichtdenaturierende Konzentrationen von Guanidin können aber auch einen positiven Einfluß auf die Faltungseffizienz haben (Rudolph & Lilie, 1997). Die schnelle Renaturierung durch Verdünnung des Proteins in Puffer birgt den Vorteil, daß sich das Protein schnell unter physiologischen Bedingungen befindet und die Aggregationsneigung durch niedrigere Proteinkonzentrationen verringert wird. Im Falle der hier angestrebten Kapsidassemblierung im Anschluß oder parallel zur Faltung der VP2-Monomere durfte die Proteinkonzentration nicht zu gering sein. In ersten Renaturierungsstudien wurden 5 ml denaturiertes VP2-Protein in 6 M GdCl (200 µg/ml) ÜN gegen 5 l Renaturierungspuffer RP1 (0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA, 2 mM DTE) bei 4°C dialysiert bzw. ein Aliquot der denaturierten Proteinprobe sehr schnell in Renaturierungspuffer I auf eine Konzentration von 20, 40 bzw. 200 µg/ml verdünnt und dann bei 4°C ÜN inkubiert. Nach circa 15 h war das VP2-Protein in beiden Renaturierungsansätzen großflockig präzipitiert.

Faltungsprozesse werden stark durch physikalische Parameter, wie pH, Ionenstärke oder Temperatur, aber auch verschiedene Pufferzusätze beeinflusst. Die *in vitro*-Faltungseffizienz vieler Proteine wird durch L-Arginin gesteigert. Die Guanidinogruppe des Arginin wirkt weniger strukturdestabilisierend wie Guanidin. Es erhöht vermutlich die Löslichkeit von ungefalteten



Proteinen und Faltungsintermediaten ohne signifikanten destabilisierenden Einfluß auf die native Proteinstruktur zu haben (Rudolph & Lilie, 1996). Parvovirus-Kapside haben spezifische Bindungsstellen für divalente Kationen. Für das Insektenparvovirus GmDNV wurden stabilisierende Effekte von Calcium- und Magnesium-Ionen auf die Kapside, möglicherweise durch eine durch diese Ionen induzierte Konformationsänderung an der 5-fach Symmetrieachse, beschrieben (Simpson *et al.*, 1998). Entsprechend diesen Erkenntnissen wurden verschiedene Puffersysteme RP2, RP3, RP4 und RP5 (Tabelle 19) in Renaturierungsansätzen auf Basis schneller Verdünnung ausgetestet.

*Tabelle 19: Übersicht zur Renaturierungspuffersystemen.*

Puffer	Zusammensetzung
<b>RP1</b>	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA; 2 mM DTE
<b>RP2</b>	0,1 M Na-P-P, pH 7,5; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,9 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2 mM DTE
<b>RP3</b>	0,1 M Na-P-P, pH 7,5; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,9 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2 mM DTE; 0,5 M L-Arginin
<b>RP4</b>	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,9 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2 mM DTE
<b>RP5</b>	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,9 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2 mM DTE; 0,5 M L-Arginin

Die Verdünnung aus konzentrierten, denaturierten VP2-Proteinlösungen in den Renaturierungspuffern RP2 bis RP5 erfolgte nach dem in Abbildung 37 dargestellten Schema. Dabei wurde die solubilisierte Ausgangsprobe (14,2 mg/ml Protein in 6 M GdCl) sequentiell mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 auf 4, 3, 2 und 1,5 M GdCl verdünnt. Ziel dieser Verdünnungen war die Verfügbarkeit des Proteins vor den Renaturierungsversuchen in vollständig denaturierter Form bzw. in möglicherweise teilgefalteten Intermediaten im Bereich des GdCl-Solubilisierungsüberganges. Da auch bei GdCl-Konzentrationen kleiner 3 M keine Aggregation sichtbar wurde, wurden diese Proben in die Versuchsreihe einbezogen. Die durch schnelles Verdünnen in jeweiligen Renaturierungspuffer gewonnenen Proben wurden über Nacht bei 4°C gelagert und nach visueller Bewertung durch Zentrifugation bei 20000 rpm für 20 min von aggregierten Proteinkomplexen befreit. Die Zentrifugationsüberstände wurden in der SDS-PAGE analysiert. Entsprechend der erwarteten Wirkung von L-Arginin konnte in den in Puffer RP3 und RP5, im Gegensatz zu RP2 und RP5, verdünnten Proben keine Proteinpräzipitation registriert werden. Anhand der silbergefärbten SDS-PAA-Gele konnte die löslichkeits- oder stabilitäts-begünstigende Wirkung von L-Arginin bestätigt werden. Es waren keine Unterschiede zwischen den Na-P-P und Tris-basierenden Puffern zu beobachten. Die Ausbeute an solubilisiertem Protein war in Arginin-haltigen Renaturierungspuffern unabhängig von der GdCl-Konzentration in der Ausgangslösung, ohne Arginin war die Ausbeute bei Verdünnungen aus 2 M GdCl im Vergleich zu 3, 4 und 6 M deutlich geringer. In der 1,5 M GdCl-Proteinlösung wurde keine Proteinpräzi-

pitation beobachtet, bei Absenken der GdCl-Konzentration auf 1 M fiel das Protein jedoch teilweise aus.

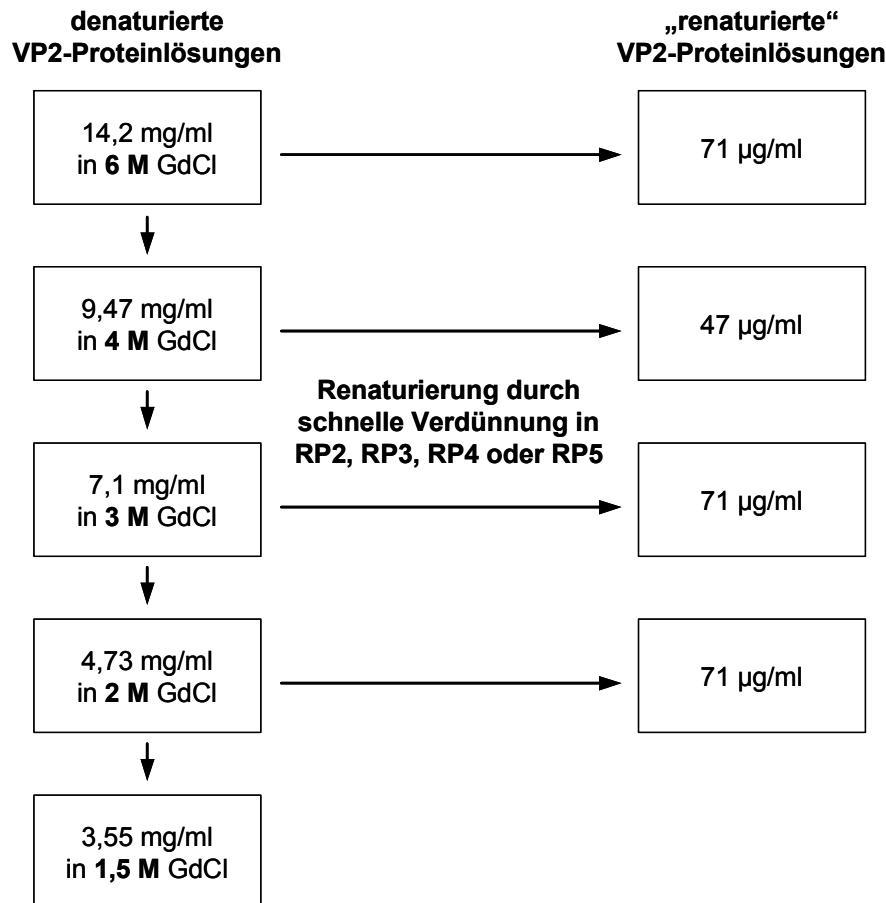
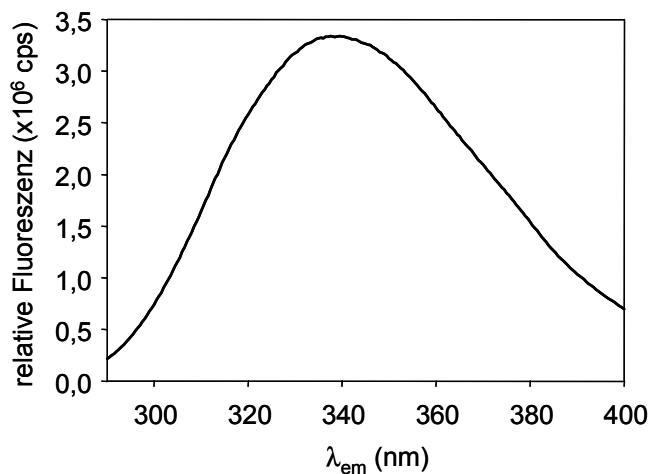


Abbildung 37: VP2-Renaturierung durch sequentielles Verdünnen.

Im Fluoreszenzemissionsspektrum wurde überprüft, ob das in Lösung befindliche VP2 die für das VP2 nativer Kapside charakteristische Emissionsmaximum von 333 nm zeigt. Wie für die aus 4 M GdCl in RP5 verdünnte Probe in Abbildung 38 gezeigt, unterschied sich das Fluoreszenzemissionsspektrum der „renaturierten“ Probe signifikant von dem nativer Kapside. Das Maximum (339,5 nm) war deutlich in Richtung des Emissionsmaximums lösungsmittel-exponierten Tryptophans verschoben. In entfalteten Proteinen, die Tryptophan enthalten, wird im allgemeinen neben einer Wellenlängenverschiebung eine Intensitätsveränderung beobachtet (Schmid, 1989). Im vorliegenden Fall wurde das Maximum des Emissionsspektrums nicht bis 350 nm verschoben und bei rechnerischem Ausgleich von Proteinkonzentrationsunterschieden nur eine geringfügige Intensitätsveränderung beobachtet. Das läßt vermuten, daß das „renaturierte“ VP2-Protein teilweise in gefaltetem Zustand vorliegen könnte.



*Abbildung 38: Pufferkorrigiertes Fluoreszenzemissionsspektrum von Verdünnungs-„renaturiertem“ VP2-Protein.*

*Temperatur: 25°C; Schichtdicke: 1 cm; spektrale Bandbreiten: Anregung 5 nm / Emission 5 nm; Anregungswellenlänge: 280 nm.*

Im Ergebnis der oben aufgeführten Untersuchungen wurde für die Renaturierung bei hohen Proteinkonzentrationen, d.h. zur Renaturierung mittels Dialyse, der Puffer RP5 als Basispuffer verwendet. Pufferzusätze, wie Harnstoff oder GdCl, können in nicht-denaturierenden Konzentrationen einen positiven Einfluß auf die Faltungseffizienz haben (Rudolph & Lilie, 1997). Eine denaturierte VP2-Proteinlösung in 1,5 M GdCl (3,55 mg/ml) wurde gegen ein 100-faches Volumen Puffer RP5 mit (Probe A) oder ohne 0,5 M GdCl (Probe B) ÜN bei 4°C dialysiert. Nach circa 15 h konnte keine Proteinpräzipitation in den Proben nachgewiesen werden. Die Proben wurden in der Folge zur Entfernung der Pufferzusätze GdCl und L-Arginin gegen RP4 (100-faches Volumen, 4°C) dialysiert. Das in großen Anteilen ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert und die Überstände im WesternBlot analysiert. In den Überständen beider Ansätze konnten nur geringe VP2-Mengen detektiert werden. Die Proteinausbeute in der Probe B war etwa doppelt so hoch als die in Probe A. Im vorliegenden System konnte kein faltungsbe günstiger Effekt von geringen GdCl-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die bei Verdünnen gezeigte löslichkeits-oder stabilitätsbegünstigende Wirkung von L-Arginin konnte auch in diesen Renaturierungsansätzen bestätigt werden.

Im weiteren sollte geklärt werden, welche Mindestkonzentration von L-Arginin zur Erhaltung der VP2-Löslichkeit notwendig ist. Dazu wurde die denaturierte VP2-Proteinlösung in 2 M GdCl (2,5 mg/ml) zur Entfernung von GdCl gegen ein 100-faches Volumen RP5 ÜN bei 4°C dialysiert. Nach Absenken der L-Arginin-Konzentration auf 0,245 M mußte eine leichte Trübung der Lösung durch geringe Mengen präzipitierten Proteins durch Zentrifugation beseitigt werden. Anhand des Zentrifugationsüberstandes wurde deutlich, daß VP2-Protein in Gegenwart von 0,25 M L-Arginin bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml löslich bleibt. Der Zentrifugationsüberstand wurde mittels Gelfiltration und im direkten Kapsid-ELISA auf das Vorliegen von VP2-Kapsiden untersucht. In der Gelfiltration befanden sich die proteinhaltige Fraktion der „renaturierten“ VP2-Probe wie die VP2-Kapside der Kontrolle im Ausschlußvolumen (Abbildung 39). In

der Probe befanden sich also größere Proteinkomplexe. Die Qualität dieser Komplexe, d.h. ob es sich um korrekt gefaltete und assemblierte VP2-Kapside oder Proteinaggregate handelt, wurde daher mit einem kapsidspezifischen Antikörper 860-55D im ELISA überprüft. Es konnten keine Kapsidstrukturen durch den Antikörper erkannt werden.

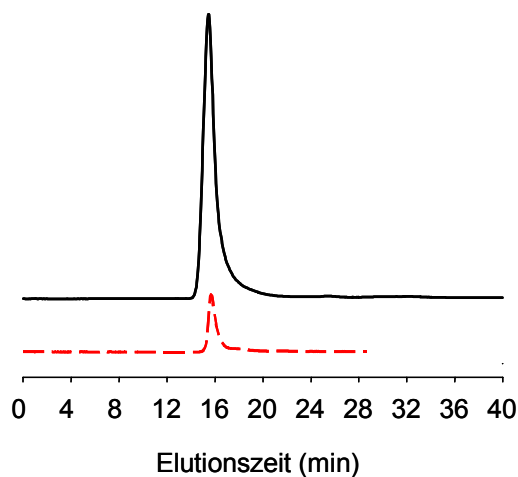


Abbildung 39: Elutionsprofil von 2  $\mu\text{g}$  in 0,25 M L-Arginin „renaturierter“ VP2-Probe (—) und von aus dem Baculo/Sf9-Expressionssystem gewonnener VP2-Kapside (0,825  $\mu\text{g}$  Protein) (---) in der Gelfiltration.

Ähnliche Beobachtungen wurden in *in vitro*-Assemblierungsstudien zu Proteinkapsiden eines anderen humanen Parvovirus, für das adeno-assoziierte Virus 2 (AAV-2) beschrieben. Im Baculo/Sf9-System produzierte und in 8 M Harnstoff denaturierte AAV-2-Kapsidproteine präzipitierten bei vollständiger Entfernung des Denaturierungsmittels. In Gegenwart von 0,03 mM L-Arginin konnten lösliches Kapsidprotein bis zu einer Konzentration von maximal 0,1 - 0,2 mg/ml angereichert werden, wobei im Präparationsprozeß große Materialverluste durch Aggregation verzeichnet wurden. Die Analyse der „renaturierten“ AAV-2-Kapsidproteine mittels Sedimentationsanalyse im Saccharosegradienten zeigte, daß bei Proteinkonzentrationen von 0,05 mg/ml vor allem Monomere vorlagen und erst bei Konzentrationen ab 0,124 mg/ml verstärkt Oligomerisierung, eine Voraussetzung für die Kapsidbildung, erfolgte. Die AAV-2-Kapsidproteine zeigten eine starke Tendenz zur Präzipitation bei Konzentrationen über 0,2 mg/ml. Auch die elektronenmikroskopische Analyse ergab keine Hinweise auf Kapsidassemblierung bei Proteinkonzentrationen bis 0,2 mg/ml. Erst in Gegenwart von HeLa-Zellextrakten konnten *in vitro* unabhängig von ATP- oder Calciumzugabe in geringen Mengen kapsidähnliche Strukturen rekonstituiert werden, die immunchemisch und elektronenmikroskopisch nicht von in transfizierten HeLa-Zellen produzierten Kapsiden unterschieden werden konnten (Steinbach *et al.*, 1997).

Zusammenfassend konnte für das B19 VP2-Strukturprotein gezeigt werden, daß das Protein in Gegenwart von 0,25 M L-Arginin bis zu Konzentrationen von 2 mg/ml in Lösung gehalten werden konnte. Eine solche konzentrierte Proteinlösung ist geeigneter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur *in vitro*-Assemblierung von VP2-Kapsiden. In den Blickpunkt der

Untersuchungen sollten die Renaturierung durch Dialyse bei geringeren Proteinkonzentrationen unter Zusatz anderer Additive wie Glycerol oder Lipid/Tensid-Micellen rücken. Erfolgsversprechend erscheinen auch Assemblierungsexperimente in Gegenwart von Zellextrakten aus Baculovirus oder die Zugabe gereinigter Faltungshelferproteine.

### 4.3 Charakterisierung der Glycolipid–Kapsid–Interaktion

Die Affinität der monovalenten Bindung eines Adhäsins an individuelle Rezeptormoleküle ist oft niedrig und erst die multivalente Interaktion mit mehreren Rezeptoreinheiten führt zu einer hohen Avidität der Wechselwirkung (Lee & Lee, 1995; Mammen *et al.*, 1998). Um die vorgeschlagene Bindung von Parvovirus B19 an Globosid zu charakterisieren, wurden deshalb sowohl Bindungsexperimente in Lösung als auch Festphasen-, Hämagglutinations- und Biosensormessungen durchgeführt, die die Detektion multivalenter Wechselwirkungen mit hoher Sensibilität erlauben sollten. Für die Experimente zum Nachweis und zur Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen den Proteinkapsiden und dem Glycolipid Globosid wurden kommerziell erhältliches Globosid aus menschlichen Erythrozyten und verschiedene andere Glycolipide als Kontrollen eingesetzt (Abbildung 40). Während dem Globotriaosylceramid (CTH) das terminale *N*-Acetyl-Galactosamin fehlt, hat das Forssman-Glycolipid Globopentaosylceramid ein zusätzliches am Terminus. Der Zuckerkopf von Asialo-Gangliosid<sub>GM1</sub> besteht aus den gleichen Komponenten wie der von Globosid. Die Sequenzabfolge der einzelnen Zucker unterscheidet sich allerdings voneinander. Asialo-GM1 sollte daher die gleichen oder zumindest vergleichbare physikalische und chemische Eigenschaften wie Globosid haben.

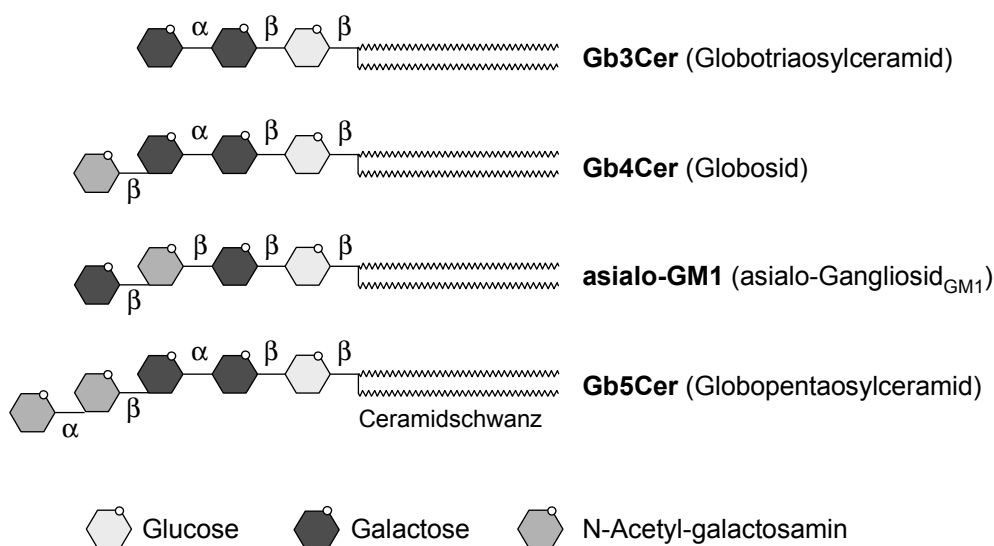


Abbildung 40: Schematische Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Glycolipide.

## 4.3.1 Hemmung der durch rekombinante VP2-Proteinkapside induzierten Hämagglutination

Der indirekte Bindungsnachweis durch Hämagglutination (HA) wurde genutzt, um publizierte Daten zur Inhibierung der VP2-Kapsid-induzierten Hämagglutination durch Globosid zu verifizieren und zu untersuchen, ob Parvovirus B19 Globosid in oligomerisiertem Zustand bindet. Die von Nilsson und Mitarbeitern hergestellten löslichen Rezeptoranaloga sollten auf ihre Interaktionsfähigkeit mit VP2-Kapsiden untersucht werden. Der verwendete Hämagglutinationstest der Firma DIAMED wurde für diagnostische Anwendungen etabliert und ist schnell und für kleine Probenvolumina einsetzbar. Die Analyse basiert auf der Separation agglutinerter und nicht-agglutinerter Erythrocyten durch Zentrifugation durch eine Gelfiltrationsmatrix. Agglutinierte Zellen konzentrieren sich auf oder im Gel, während nicht-agglutinierte Zellen ein kompaktes Pellet am Boden des Zentrifugationsgefäßes bilden (Abbildung 22).

Die zur Hämagglutination einer 0,15 %-igen Erythrocytensuspension notwendige Mindestmenge rekombinanter VP2-Kapside wurde in einer Verdünnungsreihe ermittelt (Abbildung 41). Anhand dieser Ergebnisse wurde in den weiteren Wettbewerbsversuchen eine Kapsidkonzentration von 0,12 nM (= 7 nM VP2-Protein) eingesetzt.

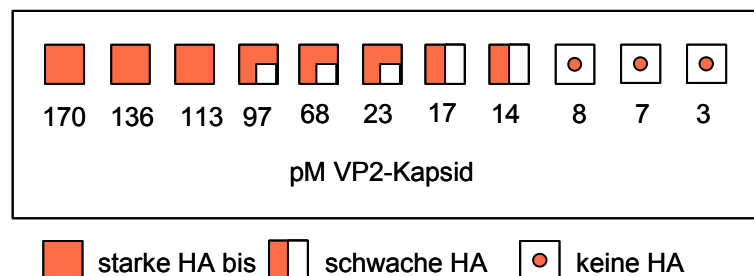


Abbildung 41: Hämagglutination (HA) von humanen Erythrocyten durch VP2-Kapside (Verdünnungsreihe). 0,15 % Erythrocyten.

Wie in Abbildung 42 dargestellt, wurde die durch rekombinante VP2-Kapside vermittelte Hämagglutination humaner Erythrocyten durch Globosid in Konzentrationen von 4 bis 5  $\mu$ M inhibiert, wenn das Glycolipid in Puffer resuspendiert wurde. In Liposomen inkorporiertes Globosid bewirkte eine Inhibierung der Hämagglutination (HAI) in Konzentrationen kleiner als 1  $\mu$ M, wahrscheinlich begründet durch eine verbesserte Zugänglichkeit des Glycolipids oder durch veränderte Lipidschicht-Eigenschaften. Die Qualität der Liposomen, d.h. die Glycolipidpräsentation über reine Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC)-Liposomen (molares Verhältnis Glycolipid / POPC = 1 : 5) oder Mischliposomen aus Phosphatidylcholin und Cholesterol (molares Verhältnis Glycolipid / Lipid = 1 : 4,8 : 4,8), hatte keinen Einfluß auf die inhibitorische Gb4Cer-Konzentration. Die für die HAI notwendige Konzentration des Forssman-Glycolipids

Gb5Cer zwischen 0,8 und 1  $\mu\text{M}$  war der von Globosid vergleichbar. Das kommerziell erworbene Globopentaosylceramid hatte einen Reinheitsgrad von ungefähr 95 %. Die HAI-Aktivität der Gb5Cer-Liposomen kann daher nicht auf mögliche Verunreinigungen des Präparats mit Globosid zurückgeführt werden. In den Experimenten konnte keine Hemmung der VP2-Kapsid-induzierten Hämagglutination durch gleiche oder höhere Konzentrationen der Kontrolllipide Gb3Cer und asialo-GM1 erreicht werden. Diese Daten bestätigen und ergänzen die publizierten Daten von Brown *et al.*, daß das in Puffer resuspendierte Globosid die Hämagglutination hemmt. Globopentaosylceramid zeigte in seinen Experimenten allerdings eine 100-fach geringere HAI-Aktivität als Globosid (Brown *et al.*, 1993). Die HAI-Aktivitäten von Gb4Cer und Gb5Cer im Gegensatz zu Gb3Cer und asialo-GM1 lassen vermuten, daß für die inhibitorische Aktivität neben der Zuckersequenz die Art der Verknüpfung der Zuckerreste eine Rolle spielt. Dies wäre kompatibel mit der Hypothese, daß das minimale Kohlenhydratepitop, das für die Bindung rekombinanter VP2-Kapside an dünn-schicht-chromatographisch aufgetrennte Glycolipide notwendig ist, ein Disaccharid mit der Sequenz HexNAc $\beta$ 3Gal ist (Cooling *et al.*, 1995).

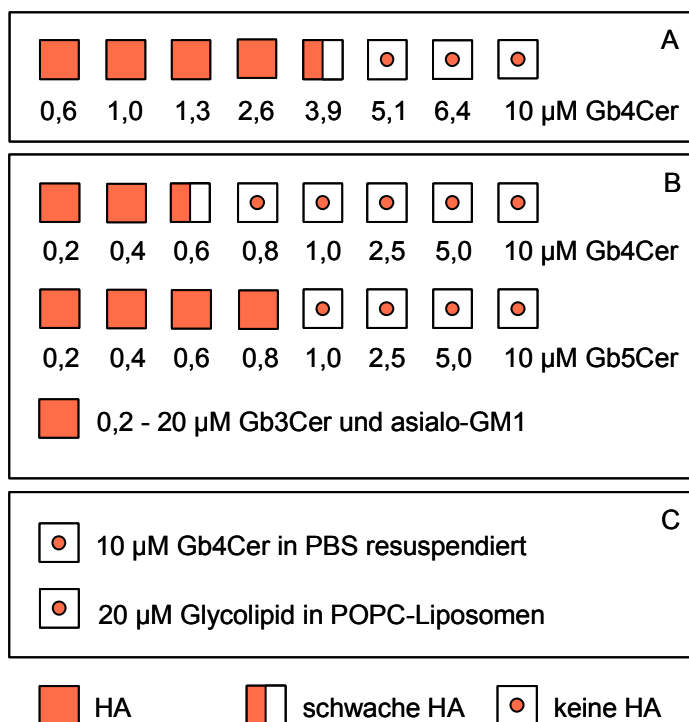


Abbildung 42: HAI durch Gb4Cer und Gb5Cer, aber nicht durch Gb3Cer und asialo-GM1. 0,15 % Erythrocyten durch 0,12 nM VP2-Kapside hämagglutiniert. (A) Gb4Cer in PBS resuspendiert, (B) Glykolipid in POPC-Liposomen (1:10) inkorporiert und (C) Kontrollen ohne Kapside.

Um die für den Viruskontakt benötigte, aktive oligomere Organisation von Globosid zu identifizieren, wurden durch eine Arbeitsgruppe an der Universität Lund in Schweden wasserlösliche, mono- und trivalente Konjugate der Globotetraose, des Zuckeranteils von Globosid, syntheti-

siert (Abbildung 43). In den trivalenten Verbindungen (SN3 und SN4) sind die Globotetraose-einheiten so verknüpft, daß sie eine räumliche Anordnung erreichen, die für den Viruskontakt postuliert wurde. Die Globotetraosen mimiken dabei die hypothetische Anordnung der Globosidmoleküle (Chipman *et al.*, 1996). Die Identität der Zuckerderivate wurde mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*) und MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption / ionization – time of flight – mass spectroscopy*) kontrolliert. SN1, SN3 und SN4 sollten in der Lage sein, die Hämagglutination durch VP2-Kapside zu unterbinden. Wenn die Trimerisierung des Zuckeranteils von Globosid eine Voraussetzung für die Virusbindung ist, sollten SN3 bzw. SN4 die besseren Kompetitoren sein.

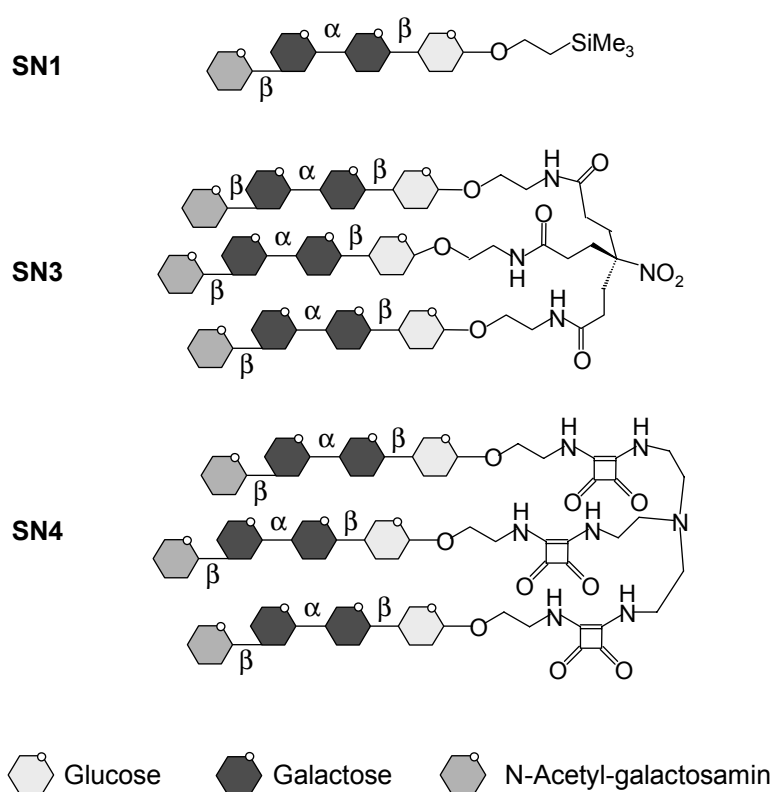


Abbildung 43: Struktur der wasserlöslichen Globotetraosederivate. SN1, monovalentes Derivat; SN3, trivalentes Derivat (Version A) und SN4, trivalentes Derivat (Version B).

Die Hämagglutination wurde durch die wasserlösliche monovalente Globotetraose inhibiert. Für die Inhibierung wurden millimolare Konzentrationen des Globotetraosederivates SN1 benötigt (Abbildung 44). Diese Konzentration entspricht der 100-fachen molaren Konzentration des Glycolipids, die für die Hemmung benötigt wird und läßt vermuten, daß der Lipidanteil in die Bindung involviert ist oder eine wichtige Rolle für die Orientierung oder Oligomerisierung des Zuckeranteils spielt.



Diese Beobachtung steht in Kontrast zu früheren Daten von Brown *et al.*, die vermuten lassen, daß die freie Tetrasaccharidkette die Bindung nicht blockiert (Brown *et al.*, 1993). Unerwarteterweise konnten die Daten nicht zu 100 % reproduziert werden. In einem der Versuchsansätze bewirkten millimolare SN1-Konzentrationen die Agglutination der Erythrocyten. In allen anderen Versuchen war diese HA-Aktivität von SN1 nicht zu beobachten. Sie ist möglicherweise auf Verunreinigungen einer SN1-Charge zurückzuführen.

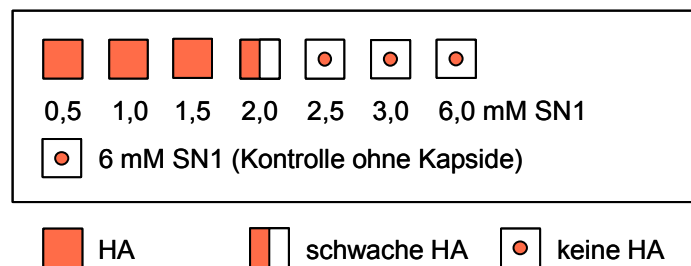


Abbildung 44: HAI durch das wasserlösliche monovalente Globotetraosederivat SN1. 0,15 % Erythrocyten durch 0,12 nM VP2-Kapside hämagglutiniert.

Die trivalenten Modellverbindungen SN3 und SN4 zeigten selbst, ohne Kapsidzusatz, sehr starke Hämagglutinationsaktivität. Zur Kontrolle der HAI sollte ein wasserlösliches, strukturell nichtverwandtes Oligosaccharid aus humaner Milch, Lacto-*N*-Fucopentaose I (LNF1;  $\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}$ ), eingesetzt werden. Es gibt starke Hinweise, daß solche Oligosaccharide potente Inhibitoren der bakteriellen Adhäsion an Epithelzellen sind und als lösliche Rezeptoranaloga fungieren (Kunz & Rudloff, 1996). Ein Glycolipid, das LNF1 als Kohlenhydratanteil enthielt, konnte bei Brown *et al.* keine Inhibierung der Kapsid-induzierten Hämagglutination verursachen (Brown *et al.*, 1993). Analog zu SN4 hämagglutinierte wasserlösliches LNF1 die humanen Erythrocyten selbst. Die durch 0,5 mM LNF1 induzierte Hämagglutination von 0,15 % Erythrocyten konnte wie die SN4-vermittelte HA durch POPC-Liposomen unterbunden werden.

Eine durch die trimere Verbindung induzierte HA ließ zunächst vermuten, daß sich auf den Erythrocyten ein Globotetraoserezeptor befindet. Daher könnte die Inhibierung der Kapsid-induzierten Hämagglutination durch Globosid und die monomere Verbindung SN1 das Resultat einer Interaktion dieser Substanzen mit den Erythrocyten anstelle der Kapside sein. Allerdings agglutinierten Gb4Cer-dotierte Liposomen humane Erythrocyten nicht und die SN4-vermittelte Hämagglutination konnte scheinbar unspezifisch sowohl durch POPC-Liposomen mit Glycolipid als auch effizient durch POPC-Liposomen ohne Glycolipid inhibiert werden (Abbildung 45).

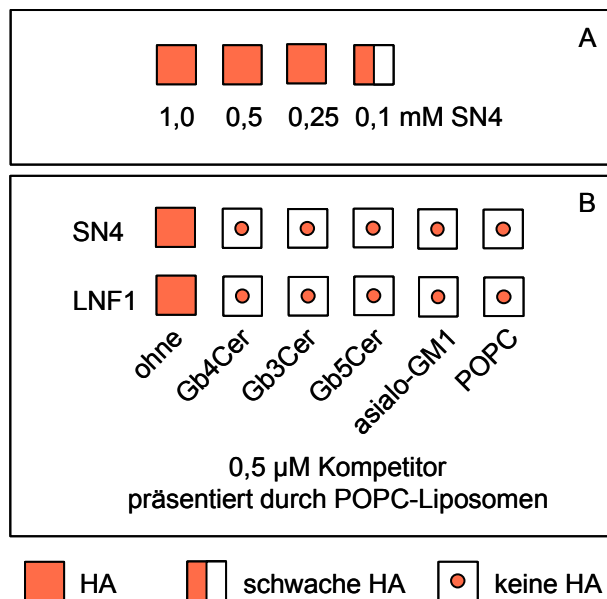


Abbildung 45: (A) HA von 0,15 % Erythrocyten durch die trivalente Zuckerverbindung SN4 und (B) Hemmung der durch 0,25 mM SN4 oder 0,5 mM Lacto-N-Fuco-pentaose I induzierten HA von 0,15 % Erythrocyten durch Liposomen.

Die Hemmung der SN4-induzierten Hämagglutination durch das monovalente Globotetraose-derivat SN1 konnte bislang nicht gezeigt werden, da die für den Versuch herangezogene SN1-Charge wahrscheinlich aufgrund von Verunreinigungen selbst Hämagglutination verursachte. Die Zuckerderivate standen grundsätzlich nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung. Die Versuchswiederholung zur Hemmung der SN4-vermittelten HA durch SN1 steht daher noch aus.

Die durchgeführten Experimente zeigten, daß die grundlegenden Mechanismen der für die freien Zucker bzw. für Glycolipide im Untersuchungssystem beobachteten Interaktionen verschieden sind. Im Gegensatz zu SN1 zeigten die wasserlöslichen Zucker SN4 und LNF1 Hämagglutinationsaktivität. Der zugrundeliegende Kontakt wurde anscheinend unspezifisch durch POPC gehemmt. Unklar bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt, ob die SN4-vermittelte HA-Aktivität durch die Multivalenz von SN4 ermöglicht wird und monovalentes SN1 in ähnlicher Weise wie eine singuläre Globotetraoseeinheit von SN4 mit den Erythrocyten wechselwirken kann oder ob chemische Verunreinigungen in den Zuckerpräparaten Änderungen der Erythrocytenoberfläche zugunsten einer Agglutination der roten Blutkörperchen induzieren. Letzteres wird unterstützt durch die einmalig beobachtete HA-Aktivität eines SN1-Präparates. Sollte ein niedrigaffiner, spezifischer Kontakt zu den Erythrocyten über die Globotetraoseeinheiten von SN4 vermittelt werden, müßte die SN4-induzierte HA durch monovalentes SN1 hemmbar sein. Gegebenenfalls ist dann die Hemmung der Kapsid-induzierten HA durch SN1 auf die Wechselwirkung des Zuckers mit Erythrocyten zurückzuführen und nicht auf eine spezifische Wechselwirkung mit den postulierten Globotetraosebindestellen auf dem B19-Proteinkapsid.

POPC war für die Hemmung der Kapsid-vermittelten HA nicht ausreichend. Dies läßt vermuten, daß die molekularen Grundlagen der Kapsid- bzw. Zucker-induzierten Hämagglutination unterschiedlicher Natur sind.

Die Hemmung der Kapsid-induzierten Hämagglutination durch Glycolipide ist abhängig von der Struktur des Kohlenhydratanteils. Globosid und Globopentaosylceramid bewirken im Gegensatz zu asialo-GM1 und Gb3Cer die Hemmung der HA. Eine durch die glycolipiddotierten Liposomen vermittelte HA konnte in keinem Fall beobachtet werden. Die Aktivitäten von Globosid und Globopentaosylceramid scheinen daher durch eine direkte, spezifische Glycolipid-Kapsid-Wechselwirkung und folglich durch eine Verdrängung der Erythrocyten vom Kapsid vermittelt zu werden. Die Erkennung von Makromolekülen durch Glycosphingolipide ist eng verbunden mit der Natur des Kohlenhydratanteils, wird aber sekundär auch durch die Struktur des Lipidanteils moduliert (Jones *et al.*, 1997). Die Korrelation zwischen polyvalenter Avidität und Affinität in Lösungen kann sehr gering sein. Zum Beispiel hat die Präsentation von Kohlenhydraten an Polymeroberflächen einen profunden Einfluß auf die Interaktion des Liganden mit einem Proteinrezeptor (Liang *et al.*, 1997).

Die Bindung von Glycolipid an rekombinante B19-Proteinkapside und der Wirkungsmechanismus der freien Oligosaccharide mußte entsprechend diesen Beobachtungen anstatt in dem komplexen, schwer kontrollierbaren Hämagglutinationssystem in anderen, direkten Nachweis-systemen evaluiert und verglichen werden.

### **4.3.2 Studien zur Glycolipid-Proteinkapsid-Interaktion in Festphasen-Bindungsassays**

Die Etablierung der folgenden Experimente sollte der direkten Verifizierung und Charakterisierung des Virus / Globosid-Kontaktes durch Bestimmung von Affinitäten und der Kinetik der Bindung dienen und kompetitorische Untersuchungen mit den wasserlöslichen Rezeptor-analoga und die Identifizierung anderer kompetitorischer Substanzen ermöglichen. Den verwendeten Puffersystemen wurden standardmäßig  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zugesetzt, da divalente Ionen häufig eine Rolle bei Virus / Rezeptor-Interaktionen spielen (Ebenbichler *et al.*, 1996; Bishop & Anderson, 1997; Pietropaolo & Compton, 1999; Meier *et al.*, 2000). Für das *Canine Parvovirus* und das *Feline Panleukopeniavirus* wurden Calcium-Bindestellen innerhalb und in Nachbarschaft eines flexiblen Oberflächen-Loops, bestehend aus den Resten 359 bis 375 des Kapsidproteins gefunden. Diese Aminosäurereste einschließlich der calciumbindenden Regionen sind essentiell für die virale Infektiosität und Hämagglutinationsaktivität des Virus. Die Loop-Konformation wird durch die Calciumkonzentration und den pH-Wert beeinflusst. Es wird angenommen, daß die Region in die Bindung eines nicht-identifizierten Rezeptormoleküls involviert ist und die Wirtszellspezifität beeinflusst (Simpson *et al.*, 2000). Auch bei dem Insekten-

parvovirus *Galleria mellonella* *Densovirus* implizieren experimentelle Daten, daß Calcium- und Magnesiumionen konformationelle Änderungen in der Kapsidstruktur bewirken, auch wenn die Bindung der Ionen an eine mögliche Bindestelle in der Cryo-Elektronenmikroskopie nicht gezeigt werden konnte (Tijssen & Kurstak, 1979; Simpson *et al.*, 1998).

**Fluoreszenz-basierende Bindungsstudien zum Glycolipid-Kapsid-Kontakt:** Die Rezeptor-interaktion von Parvovirus B19 konnte nicht über Fluoreszenzemissionsänderungen bei Bindung von Globosid an rekombinante VP2-Kapside in Lösung untersucht werden, da die Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken in einer 0,33 nM Kapsidlösung (0,012 mg VP2/ml) durch die starker Adsorption der Kapside an die Küvettenwände verhindert wurde. Daher wurde ein fluoreszenz-basiertes Bindungsassay an der festen Phase etabliert. Die VP2-Kapside wurden dazu mittels  $\alpha$ -VP2-IgG an der Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Präsentation über spezifische Antikörper sollte die räumliche Zugänglichkeit der Kapside im Vergleich zu einem direkten Beschichten der Kunststoffoberfläche verbessern. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden der Kapsidschicht fluoreszenz-markierte Liposomen präsentiert, die Globosid oder eines der Kontrollglycolipide enthielten. Der Test konnte durch Vorinkubation mit Kompetitorsubstanzen ergänzt werden (Abbildung 46). Die gebundene Fluoreszenz und die im Überstand verbliebene Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-ELISA-Readers bzw. im Fluorimeter determiniert.

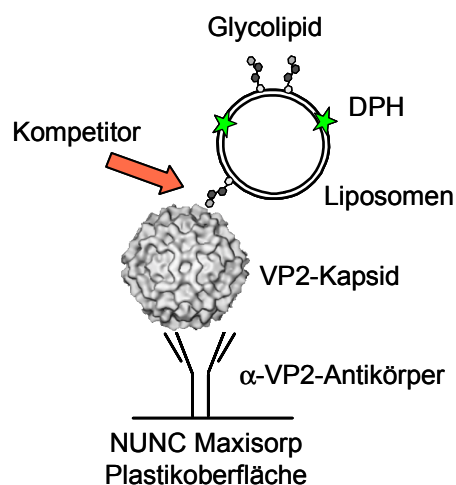


Abbildung 46: Versuchsprinzip des Fluoreszenz-basierten Festphasenbindungsassays.

Als Fluoreszenzmarker wurde Diphenylhexatrien (DPH) eingesetzt. DPH fluoresziert nicht in wässriger Umgebung (Abbildung 47B). Aus dem Anregungs- und Emissionsspektrum wurden eine praktikable Anregungswellenlänge bei 355 nm und Emissionswellenlänge bei 460 nm ausgewählt. Die Wahl der Emissionswellenlänge erscheint suboptimal, war aber abhängig von den zur Verfügung stehenden Filtern. Des weiteren sollte das Hintergrundsignal durch einen ausreichenden Abstand von Anregungs- und Emissionswellenlänge gering gehalten werden

(Abbildung 47A). Der Vorteil des Versuchsansatzes ist, daß weder Rezeptor noch Adhäsion zur Markierung chemisch modifiziert werden mußten.

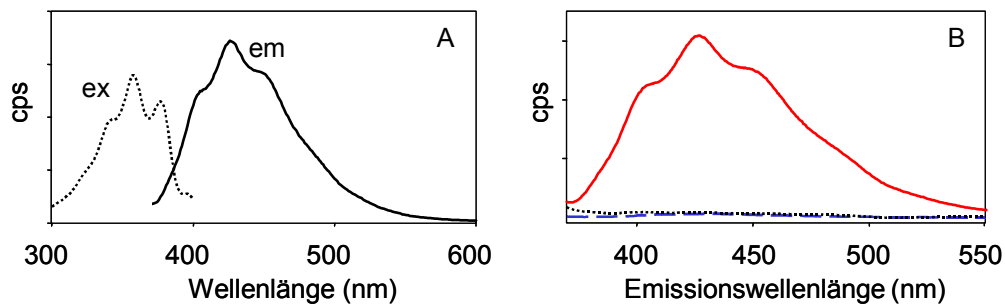


Abbildung 47: DPH – Diphenylhexatrien. (A) pufferkorrigiertes Anregungs- und Emissionspektrum von 0,15 µM DPH in Liposomen aus L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (ca. 8 µM) und Cholesterol (6,5 µM) und (B) Fluoreszenzspektrum von DPH-Liposomen (—) im Vergleich zu DPH in PBS (.....) und Liposomen ohne DPH (— — —). Messung im Fluorimeter FluoroMax-2®; spektrale Bandbreiten: Anregung 5 nm / Emission 10 nm; 1 ml Probenvolumen; Temperatur: 25°C.

Zur Etablierung der Versuchsbedingungen wurden Vorversuche zur Zusammensetzung des Beschichtungspuffers und zur Qualität der Antikörperprobe durchgeführt und verschiedene Blockierungsreagenzien getestet. Dazu wurde das an der Kunststoffoberfläche immobilisierte Immunglobulin G mit einem IgG-spezifischen, AP-gekoppelten Antikörper detektiert. Das verwendete Puffersystem hatte keinen Effekt auf die Beschichtungseffizienz mit Antikörper, es konnten keine Unterschiede zwischen Carbonat- und Phosphatpuffern noch Abhängigkeiten vom pH des Puffers registriert werden. Im Vergleich zu Serumproben konnten erwartungsgemäß größere Mengen kapsidspezifisches IgG aus angereicherten IgG-Fractionen immobilisiert werden. Es wurde gezeigt, daß 460 ng Protein der angereicherten IgG-Fraktion 4 pro Mikrotiter-Vertiefung ausreichend für die Sättigung der Kunststoffoberfläche waren.

ELISA-Experimente zur Kapsidbindung an der immobilisierenden Antikörperschicht zeigten, daß ab 1 µg VP2-Protein pro Loch, das entspricht einer Menge von 0,274 pmol rekombinanten Kapsids, eine Sättigung erreicht wurde. Der Nachweis der immobilisierten Kapside erfolgte mit Hilfe des Kapsid-spezifischen Antikörpers 860-55D. Für die weiteren Versuche wurden daher circa 1,5 µg VP2/Loch (0,4 pmol Kapsid = 24 pmol VP2) eingesetzt. Als Blockierungsreagenz wurde eine 3 %-ige BSA-Lösung verwendet. BSA hat eine starke Tendenz an hydrophobe und auch an hydrophile Oberflächen zu binden und könnte daher einen unerwünschten Hintergrund durch unspezifische Adhäsion der Liposomen hervorrufen. Die Anwendung einer Lösung von 2 % Saccharose, 0,1 % BSA und 0,9 % NaCl zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen hatte keinen Effekt auf die Qualität der Meßergebnisse. Die Höhe und das Verhältnis der in

Abbildung 48 dargestellten Fluoreszenzsignale veränderten sich nicht, wenn Gelatine (0,01 % in PBS) als Blockierungsreagenz eingesetzt wurde.

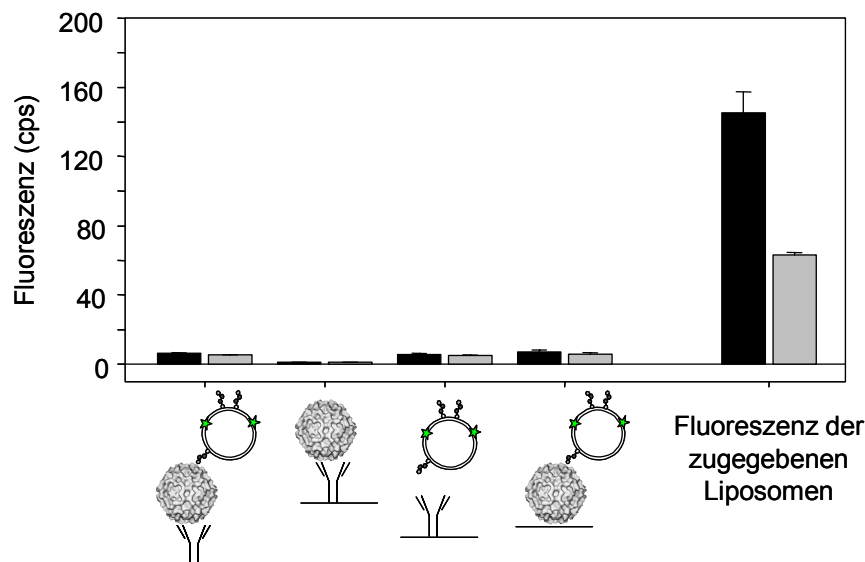


Abbildung 48: Darstellung der Fluoreszenzergebnisse. Liposomen mit Gb4Cer (■) und Kontrollliposomen ohne Glycolipid (□). Integrationszeit: 1 sec; Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachbestimmung. Zugegebene Liposomenmenge: 14 nmol Lipid / Loch.

In den Fluoreszenz-Experimenten wurde keine direkte Kapsid / Globosid-Bindung detektiert (Abbildung 48). Die verbleibende Fluoreszenz des kompletten Testansatzes war so gering wie in den Kontrollansätzen ohne Kapside oder Antikörper. Die Variation der Zahl der Waschschrte nach Liposomeninkubation (einmal bis viermal Waschen) ergab keine Änderung in der Signalhöhe. Die fehlende Bindungsaktivität wurde vorerst dadurch erklärt, daß die Sensitivität der Methode zu gering war, um einen Kontakt nachzuweisen. Aber auch bei Vermessung der Proben im sensitiveren Fluorimeter wurden keine Unterschiede, weder im Überstand der Liposomeninkubation noch in den resuspendierten „gebundenen“ Liposomenproben registriert.

**Bindungsstudien auf der Basis radioaktiv-markierter rekombinanter Proteinkapside:** Als Konsequenz wurde die Sensitivität durch die Etablierung eines Festphasenassays mit radioaktiv-markierten Kapsiden erhöht. Das Testprinzip ist in Abbildung 49 dargestellt. Eine Polystyrenoberfläche einer Mikrotiterplatte wurde mit Globosid oder einem Kontrolllipid beschichtet. Nach dem Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 3 % BSA wurden  $^{125}\text{I}$ -markierte Proteinkapside zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kapsidfraktion wurde gegebenenfalls mit Kompetitor vorinkubiert. Die nach mehrmaligem Waschen in den Löchern verbliebene Radioaktivität wurde im Gamma-Counter quantifiziert.

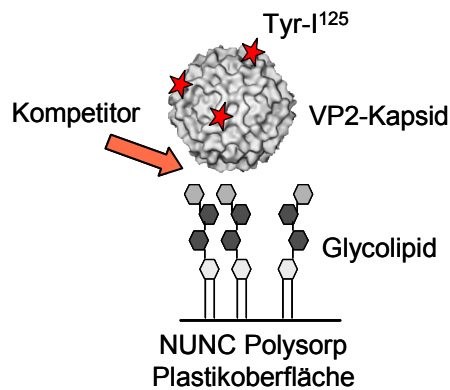


Abbildung 49: Versuchsprinzip des Festphasen-Bindungsassays mit radioaktiv-markierten Proteinkapsiden.

Eine Mikrotiterplatte wurde in Anlehnung an Brown *et al.* über Nacht mit 3,7 nmol Globosid pro Loch in methanolischer Lösung beschichtet und das Lösungsmittel im Exsikkator zur Trockne eingedunstet (Brown *et al.*, 1993). Um sicherzustellen, daß Gb4Cer dabei stabil an der Kunststoffoberfläche der Polysorp Immuno™-Platte immobilisiert wurde und um zu testen, ob der Globotetraoseanteil für Interaktionen zugänglich ist, wurde der spezifische Antikörper MC-631 nach dem ELISA-Prinzip zum Nachweis eingesetzt. Der monoklonale Antikörper MC-631 ist gegen das Kohlenhydratepitop SSEA-3 von Mausembryonen gerichtet, zeigt aber eine hohe Kreuzreaktivität mit Globotetraose, dem Zuckeranteil von Globosid (Kannagi *et al.*, 1983). Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Beschichtungstemperatur (4°C bis 70°C) keinen Einfluß auf die Immunreaktivität, respektive Menge der erkannten Zuckerregion hat, allerdings war das Hintergrundsignal der nur mit Methanol behandelten Kunststoffoberfläche bei niedrigen Temperaturen am geringsten. Das beste Signal/Hintergrundverhältnis konnte im Vergleich verschiedener Blockierungsmittel mit BSA erreicht werden. Die Reduktion des Signals auf Hintergrundniveau bei Einsatz von 0,05 % Tween 20 verdeutlichte neben dem Nachweis der Zugänglichkeit von Globotetraose durch Antikörper, daß die Glycolipid-Immobilisierung an der Kunststoffoberfläche über Wechselwirkungen mit dem Lipidanteil realisiert wurde. Die Höhe des globosidspezifischen Signals wurde nicht durch die Dauer (5 min bis 1,5 h) der Waschschriffe beeinflusst. Das bedeutete, daß bei einer einstündigen Kapsidinkubation keine oder keine nachweisbare Schädigung der immobilisierten Globosidschicht zu erwarten war.

Nach Abschluß dieser Vorversuche zur Stabilität der Glycolipidschicht wurden in weiteren Versuchen radioaktiv-markierte rekombinante Proteinkapside mit Globosid oder Kontrollglycolipiden inkubiert. Den immobilisierten Substanzen wurden 274 fmol rekombinantes VP2-Kapsid pro Vertiefung präsentiert. Die Kapside wurden durch Iodierung der Tyrosine mit Iod-<sup>125</sup> radioaktiv markiert und das überschüssige freie Natrium-<sup>125</sup>Iodid in der Gelfiltration abgetrennt (Abbildung 50).

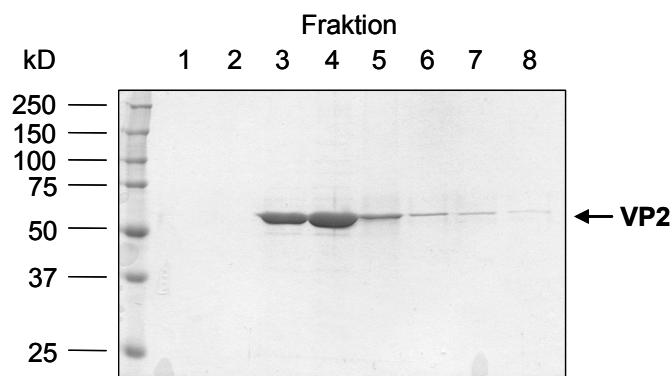


Abbildung 50: Verteilung VP2-positiver Fraktionen nach radioaktiver Markierung im Elutionsprofil von Gelfiltrationsferti säulen. Die VP2-haltigen Fraktionen 3 und 4 entsprechen den am stärksten radioaktiven Fraktionen.

200  $\mu$ l Elutionsfraktionen; 10 % SDS-PAA-Gel, coomassiegefärbt.

Als Positivkontrolle für die Erkennung der markierten rekombinanten Kapside wurde der kapsidspezifische Antikörper 860-55D an der NUNC PolySorp-Oberfläche immobilisiert. Pro Vertiefung einer 96-well ELISA-Platte wurden 1300 fmol Antikörper in einem Volumen von 100  $\mu$ l pipettiert. Von der Beschichtungslösung werden 64,7 mm<sup>2</sup> Kunststoffoberfläche bedeckt. Vor der Versuchsdurchführung wurde eine geometrische Abschätzung der Bindekapazität durchgeführt. Für die optimale Packung linsenförmiger spheroider Immunglobuline G (15 x 3 nm) als dichter Monolayer an eine NUNC MaxiSorp-Oberfläche wurde bei aufrechter Bindung der Antikörpermoleküle eine maximale Bindekapazität der Oberfläche von 650 ng/cm<sup>2</sup> kalkuliert (Esser, 2001). Die hier verwendete PolySorp-Oberfläche ist allerdings für die Ausbildung hydrophober Bindungen, d.h. für die Bindung von Lipiden und Lipoproteinen optimiert und sollte daher eine verminderte Bindekapazität für Proteine aufweisen. Zusätzlich muß beachtet werden, daß sich an der der Antigenbindestelle entgegengesetzten Seite der schweren Ketten von IgG hydrophile Kohlenhydratstrukturen befinden, die die bevorzugte Adsorption der antigenerkennenden Seite des Antikörpermoleküls an die Kunststoffoberfläche verursachen können. Dadurch wird die Menge reaktiver Antigenstrukturen an der Oberfläche weiter eingeschränkt. Entsprechende Versuche zeigten, daß die Bindekapazität an PolySorp im Vergleich zu MaxiSorp auf 220 ng/cm<sup>2</sup> eingeschränkt wurde (Esser, 2001). Aus diesen Werten kann die Präsentation von maximal 950 fmol reaktionsfähigem Antikörper 860-55D pro Loch der ELISA-Platte kalkuliert werden, vorausgesetzt die gesamte IgG-Fraktion ist intakt.

Eine ähnliche Mengenkalkulation wurde für die Immobilisierung von Glycolipid durchgeführt. Aufgrund der oben dargestellten Eigenschaften der verwendeten PolySorp-Oberfläche sollte die Präsentation des Kohlenhydratanteils zum Medium stark bevorzugt sein. Für die theoretischen Berechnungen zur möglichen maximalen Kapsidbindung an Globosid wurde vorausgesetzt, daß der Kopfgruppenflächenbedarf von Globotetraose gleich dem von Phospholipiden, d.h. 0,7 nm<sup>2</sup>, ist (Stryer, 1991). Die theoretische Dichtepackung globulärer Moleküle erfordert aus geometrischen Gründen die Einbeziehung des Faktors  $2/\sqrt{3}$  in die Kalkulation des Flächenbedarfs eines Moleküls (Esser, 2001). Daher wurde der Wert 0,7 auf 0,81 nm<sup>2</sup> korrigiert. Pro Vertiefung einer



96-well ELISA-Platte wurden ca.  $4 \times 10^6$  fmol Glycolipid bzw. Lipid in einem Volumen von 100  $\mu$ l pipettiert. Durch einen optimal gepackten Globosid-Monolayer können davon ungefähr  $1,3 \times 10^5$  fmol Globotetraose präsentiert werden. Eine optimale Kapsidpackung (Durchmesser 26 nm) ermöglicht die Bindung von maximal 176 fmol Kapsid, d.h. von 64 % der eingesetzten Kapsidmenge. Auch wenn infolge suboptimaler Präsentation z.B. durch Hydratisierung nur 10 % der Globotetraose zugänglich bleiben, steht der maximalen möglichen Kapsidbeladung von 176 fmol Kapsid in dem etablierten System ein 74-facher Überschuß an möglichen Rezeptormolekülen gegenüber.

Wie in Abbildung 51 ersichtlich wurden die Kapside durch den immobilisierten Antikörper erkannt und circa 12 fmol Kapsid pro Loch gebunden. Das sind ungefähr 7 % der theoretischen maximalen Bindekapazität. In den experimentellen Ansätzen zur Glycolipidbindung verblieb weniger als 1 % der zugegebenen Radioaktivität in den Reaktionsgefäßen (Abbildung 51). Es konnte keine spezifische Bindung an ein Glycolipid nachgewiesen werden. Unter der Annahme, daß die geringen Signale vielleicht spezifische Bindung darstellen könnten, wurden die Signalverhältnisse in weiteren Versuchen überprüft.

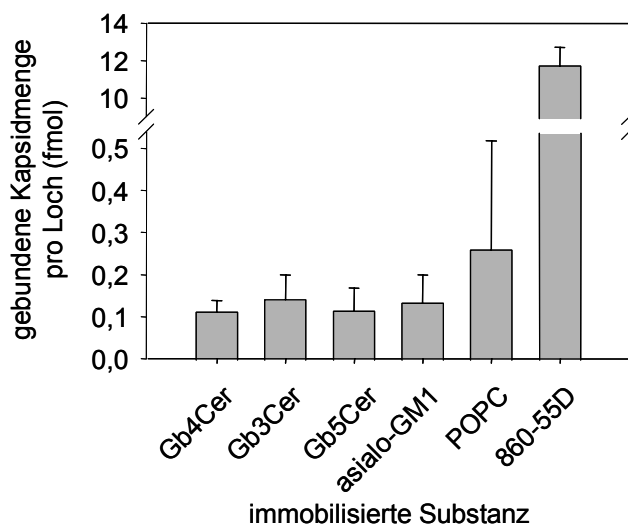


Abbildung 51: Bindung radioaktiv-markierter VP2-Kapside an immobilisierte Lipide und den Kapsid-spezifischen Antikörper 860-55D.

Zugegebene Kapsidmenge: 274 fmol (= 16,4 pmol VP2) pro Loch; 3- bis 6-fache Bestimmung.

Der Vergleich von verschiedenen Blockierungsreagenzien im Komplettassay zeigte wenig Signalunterschiede. Bei BSA war das Hintergrundsignal etwas geringer und eine scheinbare Tendenz der verstärkten Bindung an Globosid wurde beobachtet (Abbildung 52).

Die Bindungssignale waren sehr gering und die Bindungsverhältnisse zwischen immobilisiertem Globosid und Globotriaosylceramid schwankten im Vergleich mehrerer unabhängiger experimenteller Ansätze sehr stark.

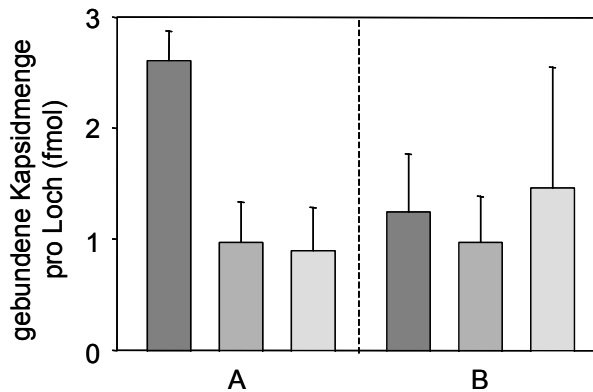


Abbildung 52: Bindung radioaktiv-markierter VP2-Kapside an immobilisiertes Gb4Cer (■), Gb3Cer (▒) und an die mit MeOH-behandelte Polysorp-Kunststoffoberfläche (░) in Abhängigkeit von dem eingesetzten Blockierungsreagenz.

(A) 3 % BSA und (B) 1,5 % BSA / 0,01 % Gelatine. Zugegebene Kapsidmenge: 274 fmol (= 16,4 pmol VP2) pro Loch; 6-fache Bestimmung.

Diese Meßwerte verstärkten die Vermutung, daß die gemessenen Signale das Resultat unspezifischer Wechselwirkungen der Kapside mit Lipid, BSA oder der Trägeroberfläche waren, wenngleich eine geringe Tendenz zu erhöhter Bindung an Gb4Cer zu beobachten war (Abbildung 53).

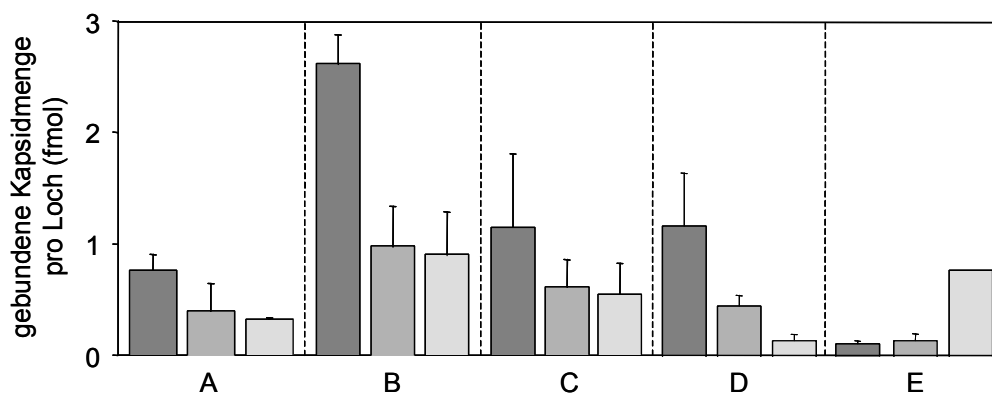


Abbildung 53: Vergleich der Bindung radioaktiv-markierter VP2-Kapside an immobilisiertes (■) Gb4Cer, (▒) Gb3Cer und an (░) die mit MeOH-behandelte Kunststoffoberfläche in unabhängigen Versuchsansätzen. Präsentierte Kapsidmenge: (A) 140 fmol und (B) – (E) 274 fmol VP2-Kapsid; 3- bis 6-fache Bestimmung.

Die Resultate weiterer Experimente zeigten aber, daß diese Bindung tatsächlich unspezifisch war. Zum einen wurden keine Unterschiede in der Bindung von heterogenen VP1/VP2-Kapsiden an Globosid und Globotriaosylceramid beobachtet (Abbildung 54). Zum anderen wurde das gemessene Signal nahe dem Hintergrundniveau nicht signifikant durch Waschschriffe beeinflusst, was bei eine schwachen unspezifischen Interaktion, die die Bindung von nur 1 % der Kapside verursacht, zu erwarten ist. Es wurde deutlich, daß von einem bis vier Waschschriffen

die Abweichungen in der Signalthöhe zwischen Mehrfachbestimmungen verkleinert wurden. Die beobachteten Signalverringerungen waren nicht selektiv, d.h. das Hintergrundsignal wurde in gleichem Ausmaß beeinflusst wie die Interaktionssignale mit Glycolipid. Zwischen viermaligem und achtmaligem Waschen konnten keinerlei Unterschiede in den gemessenen Signalthöhen und Standardabweichungen beobachtet werden.

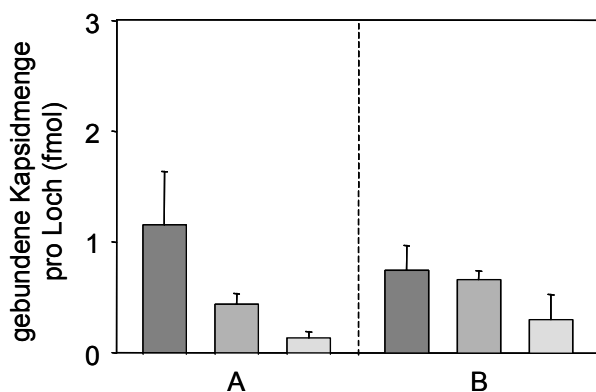


Abbildung 54: Bindung radioaktiv-markierter Kapside an Gb4Cer (■), Gb3Cer (■) und an die mit MeOH-behandelte Kunststoffoberfläche (■).

Graph (A) Homogene VP2-Kapside und (B) heterogene VP1/VP2-Kapside. Zugegebene Kapsidmenge: 274 fmol (= 16,4 pmol VP2) pro Loch; 6-fache Bestimmung.

Das Signal des VP2-Kapsid / Globosid-Kontaktes konnte in Konkurrenzexperimenten nicht durch Hämagglutinations-inhibierende mikromolare Mengen Globosid (Abbildung 55A) oder millimolaren Mengen monomerer Globotetraose SN1 beeinflusst werden. Die geringe Signalreduktion war nicht spezifisch, wie die Wettbewerbsversuche mit einer Verdünnungsreihe von SN1 zeigten und war auch in der Kontrolle mit Globotriaosylceramid zu beobachten (Abbildung 55B).

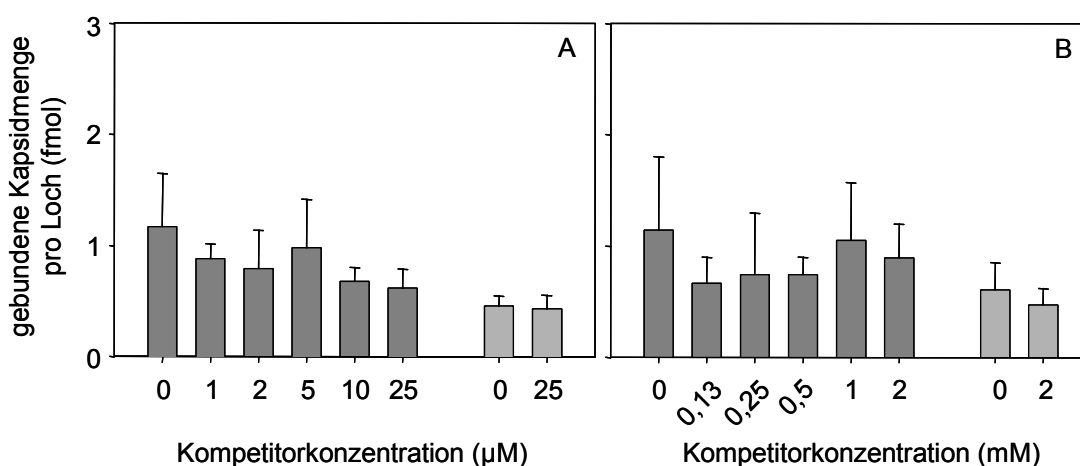


Abbildung 55: Kompetitorischer Einfluß von (A) Globosid und (B) monomere Globotetraose SN1 auf die Bindung radioaktiv-markierter Kapside an immobilisiertes Gb4Cer (■) und Gb3Cer (■). Zugegebene Kapsidmenge: 274 fmol (= 16,4 pmol VP2) pro Loch; 6-fache Bestimmung.

In dem Festphasen-Bindungstest auf Basis  $^{125}\text{I}$ -markierter Kapside konnte keine spezifische Bindung von rekombinanten B19-Proteinkapsiden an Globosid nachgewiesen werden. Eine Zerstörung der Kapside durch die Markierungsmethode ist sehr unwahrscheinlich. Die Kapside wurden unter milden Bedingungen markiert, in der Gelfiltration befand sich die VP2-positive, radioaktive Fraktion im Ausschlußvolumen, wie für die großen Kapside erwartet und bei Inkubation mit dem kapsidspezifischen Antikörper 860-55D konnte wie oben beschrieben ein eindeutiges Signal registriert werden. Die Kapside wurden auch erkannt, wenn 860-55D an einer PVDF-Membran immobilisiert wurde.  $^{125}\text{I}$ -markierte Virus-Proteinkapside wurde zum Beispiel erfolgreich in Rezeptor-Screening-Experimenten für das *Aleutian Mink Disease Parvovirus* eingesetzt (Fox & Bloom, 1999). Zudem konnte auch im fluoreszenzbasierten Assay, in dem nicht-modifizierte Proteinkapside eingesetzt wurden, keine Bindung gezeigt werden. Möglicherweise kann eine Bindung durch zu starke Hydratisierung der Lipidschicht verhindert werden. Das an der Kunststoffoberfläche immobilisierte Globosid wurde aber in Vorversuchen durch den Globotetraose-spezifischen Antikörper MC-631 erkannt.

Die hier beobachtete Situation steht scheinbar in Gegensatz zu den von Brown *et al.* in einem Festphasenassay gewonnenen Daten (Brown *et al.*, 1993). Dies war insbesondere überraschend, da sich die Testsysteme grundsätzlich nur in der Signalgewinnung unterscheiden und das in der hier vorliegenden Arbeit verwendete System sogar eine direkte Quantifizierung der Bindung ohne weitere Inkubationsschritte erlaubt. In den Versuchen von Brown wurden 137 fmol VP2-Kapsid einer in gleicher Weise wie in dieser Arbeit immobilisierten Glycolipidschicht präsentiert und anschließend in einem Sandwichverfahren mit zwei spezifischen Antikörpern detektiert. Der sekundäre Antikörper war mit Iod-125 markiert. Das detektierte Signal erreichte bei Zugabe von 205 fmol Kapsid die Sättigung und lag circa 5-fach über der Kontrolle. Es wurden keine Angaben zur Menge des gebundenen Proteins gemacht. Die angegebenen Signalthöhen in Text und Abbildung sind nicht einheitlich und eine Positivkontrolle mit direkt absorbiertem VP2 fehlt ebenso wie die Negativkontrolle mit einem strukturell verschiedenen Glycolipid mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften, z.B. asialo-GM1.

### 4.3.3 Surface Plasmon Resonance und Mikrokalorimetrie

Um die Ergebnisse des fluoreszenz-basierten Bindungsassays und des Festphasenassays mit radioaktiv-markierten Kapsiden zu verifizieren, wurde eine Biosensortechnik, die Oberflächen-Plasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) eingesetzt. Die Methode beruht auf der totalen internen Reflektion und der kollektiven Oszillation von Elektronen in der oberflächen-nahen Region verschiedener Metalle, wie Gold und Aluminium. Die von einer externen Lichtquelle ausgehende optische Welle entwickelt sich entlang der Grenzfläche zwischen dem Metall und dem umgebenden Medium, Puffer usw. und wird durch Änderungen des Refraktions-

indexes nahe der Metalloberfläche beeinflusst. Die Technik ermöglicht die Analyse von Bindungsgleichgewichten und –kinetiken.

Membranrezeptoren beinhalten hydrophobe Domänen und können veränderte Tertiärstrukturen und Bindungsaffinitäten in Lösung relativ zu denen in Membrenumgebung aufweisen. Der Aufbau von unterstützten Lipiddoppelschichten erlaubt die Analyse von membranassoziierten Liganden-Rezeptor-Interaktionen in einem Modellsystem, das der native Membrenumgebung ähnelt. Auf dem Pioneer L1 Biosensorchip wird die Lipidschicht durch Lipidvesikel aufgebaut, die in Kontakt mit den die Carboxymethyldextranoberfläche modifizierenden, lipophilen Substanzen kommen (*liposome capture technique*) und eine chemisch und physikalisch stabile Umgebung bilden. Die Liposomen werden immobilisiert und, da Moleküle in der Lipidschicht mobil sind, ist auch die Rezeptorclustering und daher die Analyse kooperativer Interaktionen möglich. Kontrovers sind die Ergebnisse von *atomic force measurements* und Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Frage, ob die Lipidoberfläche durch intakte Lipidvesikel oder durch eine kontinuierliche Lipidschicht nach Liposomenfusion gebildet wird (Cooper *et al.*, 2000; Erb *et al.*, 2000).

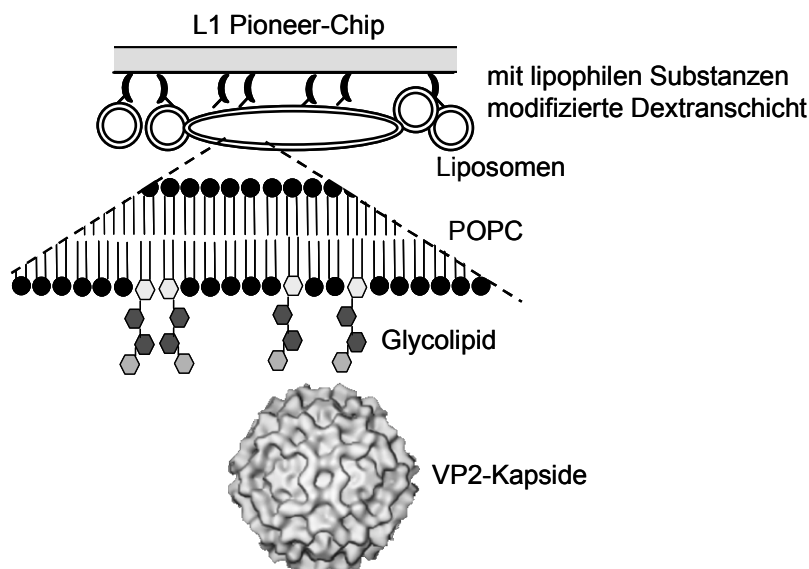


Abbildung 56: Surface Plasmon Resonance (SPR) an Lipidschichten - Versuchsprinzip.

Im Gegensatz zu Mikrotiterplatten- und Dünnschichtchromatographie-Bindungsassays erlaubt die SPR / Liposomen-Methodik die Echtzeitanalyse einer Proteinbindung ohne die Notwendigkeit der Markierung von Adhäsion oder Rezeptor. Im SPR-System wurde zum Beispiel die Bindung von Cholera toxin an Monosialo-Gangliosid  $G_{M1}$  demonstriert und Bindungsaffinitäten ermittelt, die denen mit anderen Methoden gewonnenen Daten entsprachen. In einer  $G_{M1}$ /POPC-Mischung mit einem molaren Verhältnis von 1:4 konnte keine Phasenseparation

beobachtet werden. Die Konzentration von  $G_{M1}$  in der Membran hatte kaum Einfluß auf die Bindekapazität für Cholera toxin (Terrettaz *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Glycosphingolipide mittels einer an einem Pioneer L1 Biosensorchip rekonstituierten POPC-Lipidschicht präsentiert. Das molare Verhältnis von Glycolipid zu POPC betrug 1:6. Das entspricht einem Glycolipidgehalt von circa 15 %. Im Referenzkanal wurde eine reine POPC-Lipidschicht aufgebaut (Abbildung 56).

Um sicherzustellen, daß der Kohlenhydratanteil an der Lipidschicht zugänglich ist, wurde eine Lösung des Antikörpers MC-631 in das System injiziert. Der monoklonale Antikörper MC-631 reagiert spezifisch mit Globotetraose, dem Zuckeranteil von Globosid. Wie in Abbildung 57 gezeigt, erzeugte die Antikörperinjektion zu einer Gb4Cer präsentierenden Lipidschicht ein deutliches Bindungssignal und eine Dissoziationskinetik. Mit den Kontrollsubstanzen Globotriaosyl- und Globopentaosylceramid konnte erwartungsgemäß kein Positivsignal registriert werden. Diese Ergebnisse zeigten, daß der Zuckeranteil von Globosid an der Lipidschicht zugänglich ist. Aus der Zugänglichkeit der Globotetraose konnte geschlossen werden, daß auch die Zuckeranteile der anderen Glycolipide an der Oberfläche der Lipidschicht präsentiert werden.

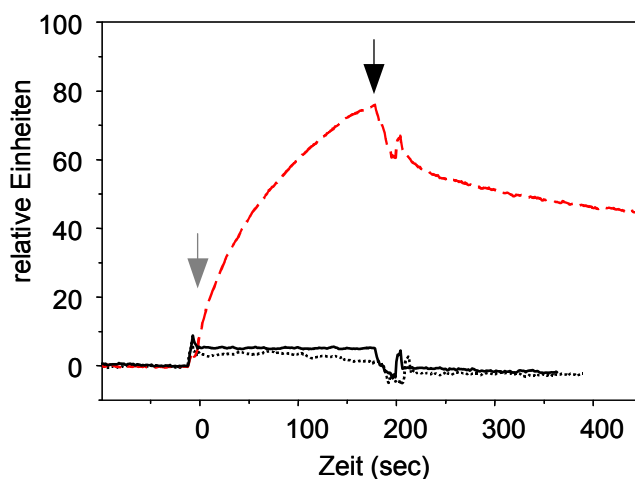


Abbildung 57: Nachweis der Präsentation und Zugänglichkeit von Globotetraose an der Lipidschicht mittels des globosidspezifischen Antikörpers MC-631.

Präsentiertes Glycolipid in POPC-Schicht (1:10): Gb4Cer (---), Gb3Cer (.....) und Gb5Cer (—). Injektionsstart und -ende sind durch Pfeile markiert. Messung gegen POPC als Referenz; Injektionsdauer: 3 min.

Um die Kapsidbindung an Glycolipide zu messen, wurden mehrere Volumina einer VP2-Kapsidlösung bekannter Konzentration in das Glycolipid-präsentierende System injiziert und optisch überwacht. BSA hat eine starke Tendenz an hydrophobe und auch an hydrophile Oberflächen zu binden und wurde daher als Kontrollsubstanz zum Ausschluß unspezifischer Bindungen herangezogen. Zum Vergleich wurde neben Aliquots einer 3  $\mu$ M BSA-Lösung auch Laufpuffer injiziert. Wie in Abbildung 58 dargestellt, konnte keine spezifische Bindung der Kapside an Globosid detektiert werden. Die Kapsidsignale befanden sich auf dem Hintergrund-

niveau der Pufferinjektion und waren sogar geringer als die durch die unspezifische BSA-Bindung hervorgerufenen Signaländerungen.

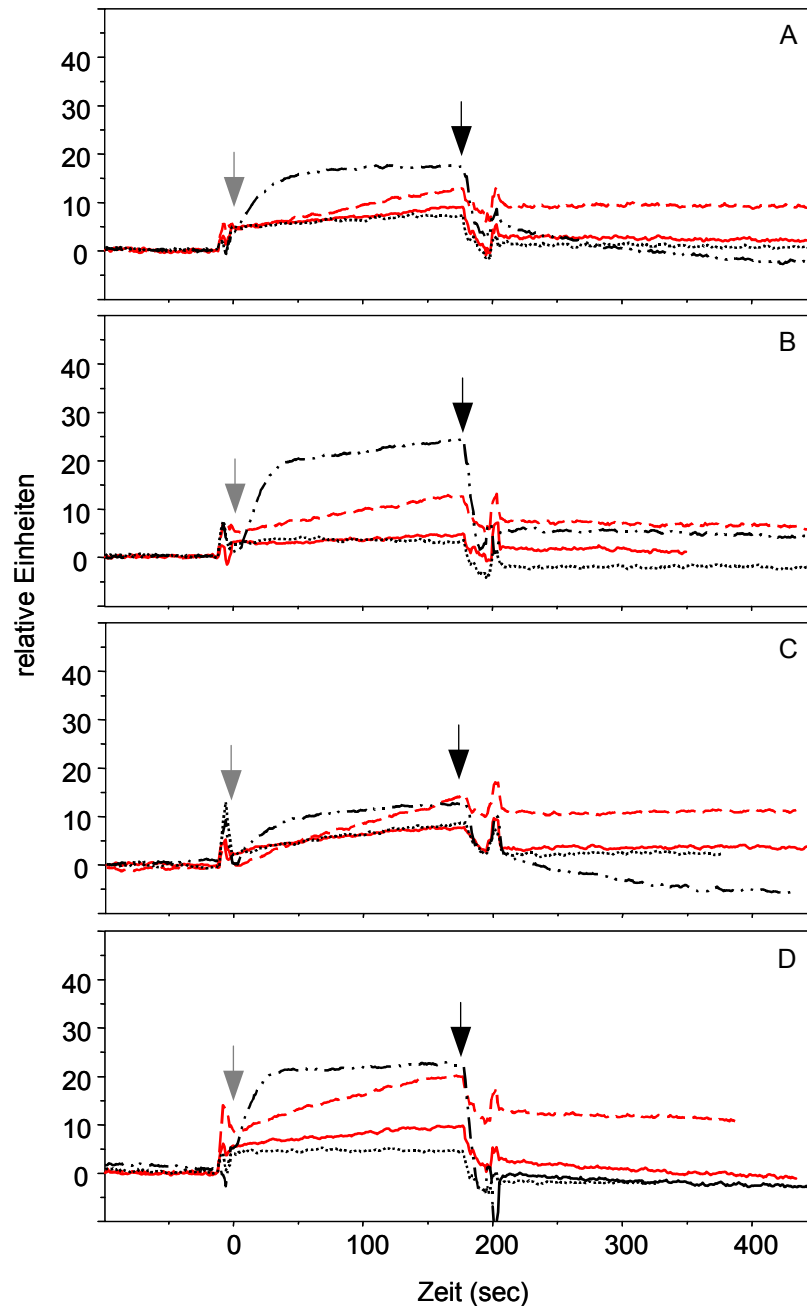


Abbildung 58: SPR an glycolipidpräsentierenden Lipidschichten in Gegenwart zweiwertiger Ionen. Graph (A) Gb4Cer, (B) Gb3Cer, (C) asialo-GM1 und (D) Gb5Cer. Injizierte Lösung: 0,33 nM VP2-Kapsid (—), 20,83 nM VP2-Kapsid (---), 3  $\mu$ M BSA (— · —) und Laufpuffer (····). Injektionsstart und -ende sind durch Pfeile markiert. Messung gegen POPC als Referenz; Injektionsdauer: 3 min.

Der Verzicht auf die zweiwertigen Ionen Magnesium und Calcium im Puffersystem hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse.

Zur weiteren Bestätigung wurde eine zusätzliche Methode zur direkten Messung des Kapsid / Globosid-Kontaktes herangezogen, die Mikrokalorimetrie. Mit dieser Methode können Bindungswärmen gemessen und die freie Energie einer Interaktion bestimmt werden, wenn diese mit einem Wärmeeffekt verbunden ist. Die meisten Protein-Protein und Protein-Liganden-Wechselwirkungen sind mit einer Wärmeabsorption oder –freisetzung verbunden. Das aufgezeichnete Signal in der Mikrokalorimetrie ist die elektrische Leistung, die von dem Instrument benötigt wird, um die Zelltemperatur relativ zu einer Referenzzelle mit Puffer konstant zu halten. In der Probenzelle wurde eine Lösung von VP2-Kapsiden mit festen Volumina einer Glycolipid-suspension titriert. Zur Beschreibung des Kapsid / Globosid-Kontaktes wurden drei verschiedene Systeme betrachtet. Zum einen wurden rekombinante VP2-Kapside mit in PBS resuspendierten Globosid titriert. Zur Kontrolle wurde Globosid in eine Tailspike-Proteinlösung titriert. Dieses Protein ist ein Bakteriophagen-Protein, das spezifisch an ein nicht-verwandtes Octasaccharid, das O-Antigen 9.12 der Salmonella-Serogruppe D1 bindet (Baxa *et al.*, 2001). Als weitere Kontrolle wurde Globotriaosylceramid zu VP2-Kapsiden titriert.

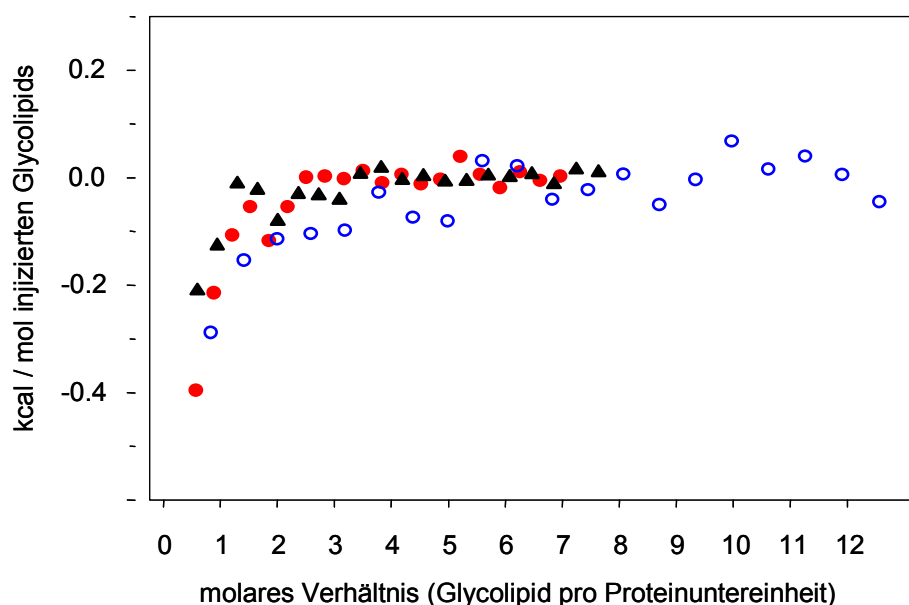


Abbildung 59: Mikrokalorimetrie. Titration Gb4Cer zu VP2-Kapsiden (●), Gb4Cer zu Tailspike-Protein (▲) und Gb3Cer zu VP2-Kapsiden (○).

An dem Verlauf der Kurven wurde keine spezifische Bindung von Globosid an VP2-Kapside sichtbar (Abbildung 59). Bei einer spezifischen Bindung könnte man Bindungswärmen von mindestens -5 bis -10 Kilokalorien pro Mol Ligand erwarten. Das  $\Delta H$  der Bindung von Tailspike-



Protein an sein spezifischen Liganden, ein Octamer beträgt z.B. -14,3 kcal/mol (Baxa *et al.*, 2001).

Entsprechend den Resultaten der vorhergehenden direkten Studien in Festphasen-Bindungsassays wurden auch mit der hochsensitiven Biosensortechnik und der Mikrokalorimetrie keine Hinweise auf eine spezifische Parvovirus B19 / Globosid-Interaktion gefunden.

#### 4.4 Nachweis möglicher Proteinrezeptoren von Parvovirus B19

Globosid ist auf der Oberfläche vieler Zelltypen nachweisbar. Die Bindung an dieses Glycolipid erklärt also nicht den ausgeprägten Zelltropismus von Parvovirus B19. Für die Erkennung und spezifische Infektion permissiver Zellen sollten daher noch andere Faktoren ausschlaggebend sein. Neben der Rolle von Kerntransport oder intrazellulärer Faktoren ist auch das Vorhandensein anderer oder zusätzlicher Rezeptormoleküle an der Zielzelloberfläche denkbar. Daher wurden erste Untersuchungen zur Identifizierung potentieller Corezeptoren durchgeführt.

Der initiale Schritt der Infektion einer Zielzelle ist die spezifische Interaktion des Viruskapsids mit Zelloberflächenstrukturen. Globosid scheint nach den in dieser Arbeit erhaltenen Daten keine feste Bindung von Parvovirus B19 an die Zielzelle zu vermitteln und kommt damit nicht als singuläres Rezeptormolekül in Frage. Offensichtlich sind noch andere Moleküle an der Erkennung und Etablierung der Infektion beteiligt. Da Virusadsorption in vielen Fällen durch Proteine auf der Zelloberfläche vermittelt wird, wurden zur Identifizierung möglicher anderer Rezeptormoleküle Membranproteinfraktionen verschiedener Zelllinien mittels gelelektrophoretischer Methoden aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und Entfernung der denaturierenden Agenzien SDS und Methanol wurden die immobilisierten Proteine mit radioaktiv-markierten, rekombinanten Proteinkapsiden inkubiert (*virus-overlay protein binding assay*, VOPBA). Diese Methode ist ein etabliertes System zum Rezeptor-Screening in komplexen Proteingemischen. So konnte zum Beispiel die spezifische Bindung der Gruppe B-Serotypen von *Coxsackievirus* an ein 100 kD-Protein aus Membranproteinextrakten permissiver Zellen gezeigt,  $\alpha V\beta 5$ -Integrin (100 kD) als Corezeptor von AAV-2 oder Glycophorin A (78,5 kD) als Bindeprotein des *Bovinen Parvovirus* identifiziert werden (de Verdugo *et al.*, 1995; Thacker & Johnson, 1998; Summerford *et al.*, 1999). Mit  $^{125}\text{I}$ -markierten Proteinkapsiden wurde ein ungefähr 67 kD großen Zelloberflächenprotein aus Leberzellen gefunden, an das das *Aleutian Mink Disease Parvovirus* spezifisch bindet (Fox & Bloom, 1999).

Problematisch für die Suche nach B19-spezifischen Proteinrezeptoren war, wie bereits mehrfach angesprochen, die Nichtverfügbarkeit eines gesicherten Zellkultursystems und der offensichtlich ausgeprägte Tropismus von Parvovirus B19 für stark replizierende Zellen eines bestimmten erythroiden Differenzierungsstadiums. Die B19-infizierbaren *in vitro*-Systeme, wie

Knochenmarkszellen oder mittels Erythropoietin zur erythroiden Differenzierung induzierbare Zelllinien, enthalten die permissive Zellen nicht in Reinkultur. Als Ausgangsmaterial für die Rezeptorsuche wurde in dieser Arbeit zum einen die Megakaryocyten-Zelllinie MB-02 ausgewählt. Diese humane, leukämische Zelllinie kann durch Erythropoietin zur erythroiden Differenzierung und damit zu für Parvovirus B19 permissiven Differenzierungsstadien stimuliert werden (Munshi *et al.*, 1993). Für die hier gezeigten Untersuchungen wurden die MB-02-Zellen drei bis fünf Tage mit Erythropoietin (EPO) stimuliert. Als Vergleichsmaterial wurde die erythro-leukämische Zelllinie K562 herangezogen (Lozzio & Lozzio, 1975). Diese Zellpopulation ist weitgehend undifferenziert und gehört zur Granulocytenlinie. Die K562-Blasten sind multipotente, hämatopoetisch maligne Zellen, die spontan zu Vorläufern von Erythrocyten, Granulocyten und Monocyten differenzieren (Lozzio *et al.*, 1981). Auf K562-Zellen konnten kein oder nur geringe Mengen Globosid nachgewiesen werden und die B19-Proteinkapsid-induzierte Hämagglutination konnte durch Membranextrakte der Zellen nicht inhibiert werden (dem Borne *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1993; Weigel-Kelley *et al.*, 2001). Die als Negativkontrolle verwendete HeLa S3-Zelllinie ist ein an das Wachstum in Suspensionskultur adaptierter Klon der ursprünglichen aus einem humanen Cervix-Karzinom etablierten HeLa-Zelllinie (Puck *et al.*, 1956). Die Zelllinien wurden kultiviert und gegebenenfalls zur Differenzierung stimuliert. Aus den Zellen wurden Membranproteinfraktionen (Memfrac) angereichert oder das Zell-Lysat als Gesamtproteinfraktion eingesetzt (Abbildung 60).

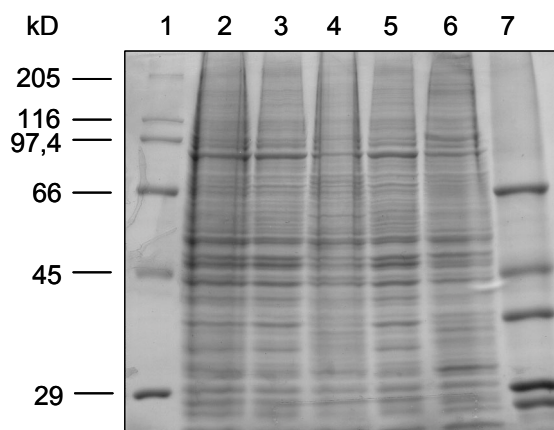


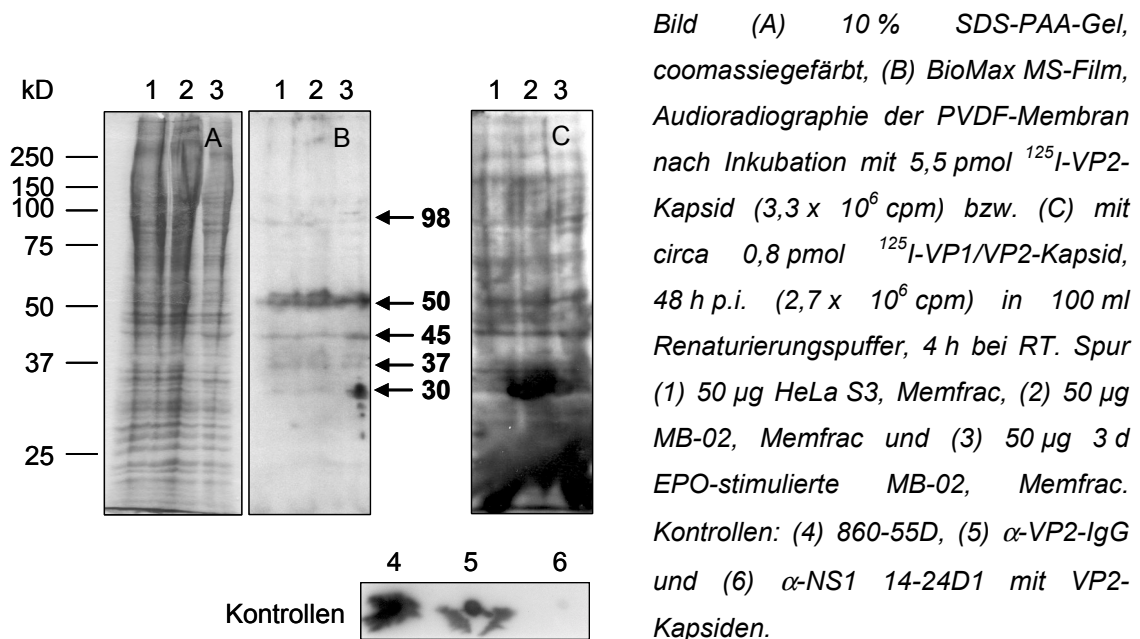
Abbildung 60: Kontrollgel zur Membranproteinanreicherung am Beispiel K562.

Spur (1) HMW, (2) Gesamtlysate, (3) Überstand und (4) Pellet der low speed-Zentrifugation, (5) Überstand und (6) Pellet der Ultrazentrifugation (Memfrac), (7) LMW. 10 % SDS-PAA-Gel, coomassiegefärbt.

Nach Auftrennung der Proteinproben in der eindimensionalen SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen wurden die Proteine auf eine immobilisierende Membran transferiert und in einem komplexen Puffersystem renaturiert. Die Membranen wurden dann mit  $^{125}\text{I}$ -markierten Kapsiden inkubiert und die gebundene Radioaktivität nach mehreren Waschschritten audioradiographisch nachgewiesen. Es wurden vier unabhängige Versuche mit VP2-Kapsiden durchgeführt, wobei der Vernetzungsgrad der proteinseparierenden Gele von 8 bis 15 % variiert wurde und Proteinfraktionen aus zwei unabhängigen Präparationen aufgetrennt wurden.

Repräsentativ sind in Abbildung 61 die Versuchsergebnisse nach Auftrennung in einem 10 %-igen Polyacrylamidgel und Inkubation der Membran mit markierten homogenen VP2- oder heterogenen VP1/VP2-Kapsiden dargestellt. Die Funktionalität des Versuchsystems wurde durch die Bindung der radioaktiven Kapside an den kapsidspezifischen Antikörper 860-55D und einen VP2-spezifischen Antikörper bestätigt. Erwartungsgemäß erfolgte keine Bindung der Kapside an einen gegen das Nichtstrukturprotein NS1 gerichteten Antikörper. In den Experimenten wurden in den Proteinextrakten fünf prominente kapsidbindende Proteine zwischen 30 und 100 kD reproduzierbar nachgewiesen. Diese Proteine waren konstitutiv in allen getesteten Zelllinien nachweisbar und sind daher nicht zelltypspezifisch. Durch Erythropoietin wurde scheinbar eine höhere Expression des 30- und 45 kD-Proteins in MB-02-Zellen induziert. Die stärkste Bindung wurde an das 50 kD große Protein beobachtet. Die Reproduzierbarkeit der Banden ließ vermuten, daß es sich um spezifische Bindungsaktivitäten handelte. Die in der Abbildung erkennbaren Banden bei 52 und 102 kD konnten nicht in allen Versuchen sicher detektiert werden. Im Bereich kleiner 37 kD wurde die Autoradiographie nach Mischkapsidinkubation nicht bewertet, da das Hintergrundsignal hier infolge eines experimentellen Fehlers beim Waschen zu hoch war.

Abbildung 61: 1D-VOPBA unter nicht-reduzierenden Bedingungen.



Die vorangegangenen Bindungsexperimente zum Nachweis der Kapsid-Globosid-Interaktion lassen vermuten, daß Gb4Cer möglicherweise im Komplex mit einem weiteren Rezeptormolekül, zum Beispiel einem Protein, erkannt wird. Sollte das der Fall sein, könnte die Inkubation der „renaturierten“ Proteine mit Globosid zu einer Verstärkung der Bindung oder zur Identi-

fizierung zusätzliche Proteinbanden führen. Wie in Abbildung 62 gezeigt, konnten nach Vorinkubation der Protein-immobilisierenden Membran mit Globosid (0,74 nM; 1 h bei RT) keine zusätzlichen prominenten Banden identifiziert werden, abgesehen von einem 75 kD großen Protein ausschließlich im Gesamtylsat von HeLa S3-Zellen, das in den Versuchen ohne Globosid-Inkubation nicht detektiert wurde. Alle vorher reproduzierbaren Banden mit Ausnahme des 37 kD-Proteins, das sowohl im Gesamtylsat von induzierten MB-02- als auch von HeLa S3-Zellen markiert wurde, waren nicht mehr sichtbar. In den experimentellen Ansätzen ohne Globosid-Inkubation war die 37 kD-Bande im Gesamtylsat deutlich stärker ausgeprägt als in den Membranproteinproben. Es könnte sich um ein intrazelluläres, lösliches oder aber ein leicht extrahierbares, membran-assoziiertes Protein handeln, dessen Erkennung durch Globosid verbessert bzw. nicht kompetitorisch beeinflusst wird. Nur sehr schwach ist im Gesamtylsat der Erythropoietin-induzierten MB-02 die 45 kD-Bande erkennbar. Ob die Kompetition der Proteinbanden durch Gb4Cer spezifisch ist, muß in weiteren Experimenten im Vergleich zu anderen Glycolipiden geklärt werden.

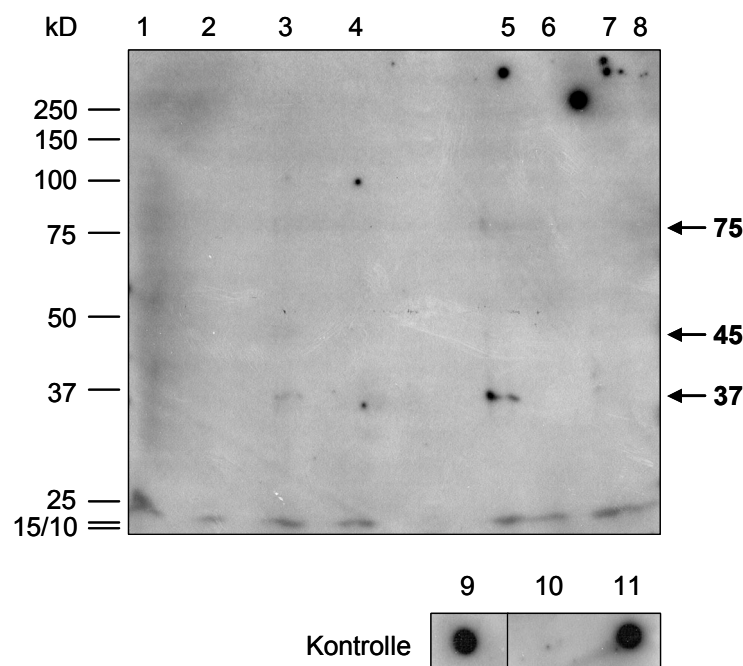


Abbildung 62: 1D-VOPBA unter nicht-reduzierenden Bedingungen nach Gb4Cer-Vorinkubation. BioMax MS-Film, Autoradiographie der PVDF-Membran nach Inkubation mit 23 pmol  $^{125}$ I-VP2-Kapsid in 100 ml Renaturierungspuffer, 4 h bei RT. Spur (1) MB-02, Gesamtylsat, (2) MB-02, Memfrac, (3) 3 d EPO-stimulierte MB-02, Gesamtylsat, (4) 3 d EPO-stimulierte MB-02, Memfrac, (5) HeLa S3, Gesamtylsat, (6) HeLa S3, Memfrac, (7) K562, Gesamtylsat und (8) K562, Memfrac; Auftrennung von je 200 µg Protein in 10 % SDS-PAA-Gel. Kontrollen: (9)  $\alpha$ -VP2-IgG, (10) E9EG2 ( $\alpha$ -Glucosidase) und (11) 860-55D.

Möglicherweise konnten in den Proteinextrakten vorhandene, aber niedrigkonzentrierte spezifische Bindeproteine von Parvovirus B19 in den vorangegangenen Experimenten aus Sensitivitätsgründen nicht erfaßt werden. Auch in Hinblick auf eine angestrebte Sequenzierung der identifizierten Interaktionspartner sollten die Proteine im präparativen Maßstab und in besserer Auflösung getrennt werden. Daher wurde zu einem zwei-dimensionalen Separationssystem gewechselt. Die zwei-dimensionale Elektrophorese (O'Farrell, 1975) mit immobilisiertem pH-Gradienten (Görg *et al.*, 1985) ermöglicht die reproduzierbare Auftrennung komplexer Proteingemische unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse. Die sehr hohe Auflösung gegenüber ein-dimensionalen Elektrophoresemethoden wird erreicht, da die Proteine nach zwei voneinander unabhängigen Kriterien, dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht, getrennt werden (Abbildung 63). Die auffällige Streifenbildung wird standardmäßig durch Modifizierung der in der ersten Dimension aufgetrennten Proteine mit Jodacetamid vermindert. Da die getrennten Proteine in den hier durchgeführten Experimenten renaturiert werden sollten, wurde auf diese irreversible Modifikation verzichtet.

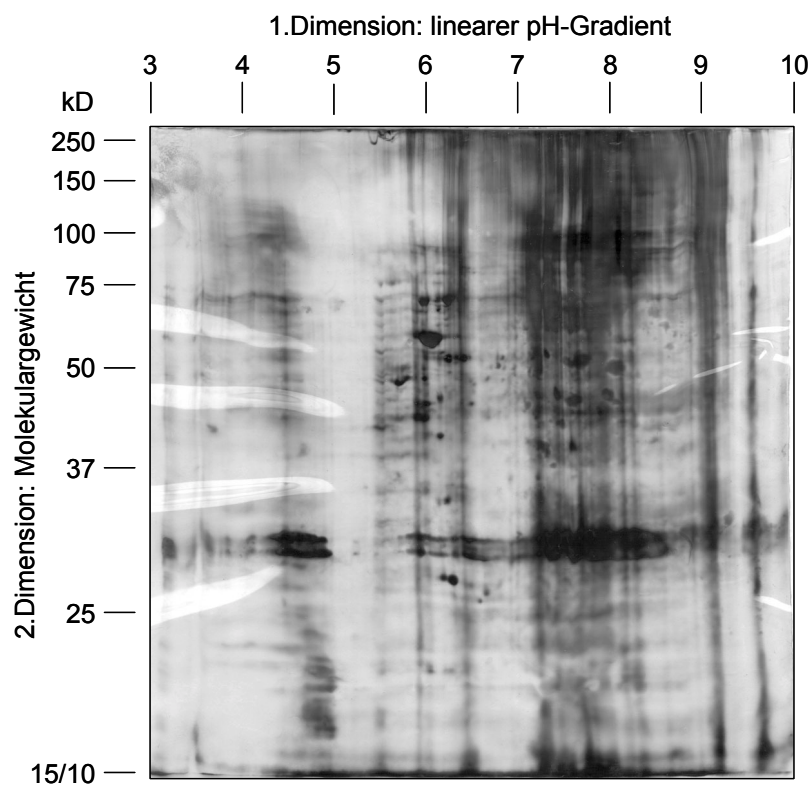


Abbildung 63: Zwei-dimensionale SDS-PAGE am Beispiel K562-Gesamtlysat (1 mg Protein). Silbergefärbtes 10 % SDS-PAA-Gel.

Die Bindung radioaktiv-markierter Kapside an verschiedene Proteinbanden war auch im 2D-VOPBA nachweisbar. Zwischen den untersuchten Zellextrakten waren wiederum keine Unter-

schiede sichtbar. Exemplarisch wurden die audioradiographischen Ergebnisse für das Gesamtlysate von K562-Zellen in Abbildung 64 dargestellt. Die meisten Kapsid-bindenden Proteine fokussierten im pH-Bereich zwischen 6,9 und 8,8. Im Gesamtlysate der K562-Zellen wurden in guter Korrelation zur ein-dimensionalen Separation unter nicht-reduzierenden Bedingungen Proteinbanden identifiziert, die bei einem Molekulargewicht von ungefähr 30, 45 und 50 kD migrierten. Bei einem Molekulargewicht von 45 kD konnte ein distinktes Protein bei einem pI von 5,7 und eine nichtdifferenzierte Bande über den Bereich von pH 7 – 9 detektiert werden. Bei einem pH von circa 4,2 fokussierten drei Kapsid-bindende Proteine, auffällig war die Doppelbande im Bereich von 30 kD. Andere circa 30 kD große Proteine wurden in der ersten Dimension bei pH 7,1 und pH 8,2 fokussiert.

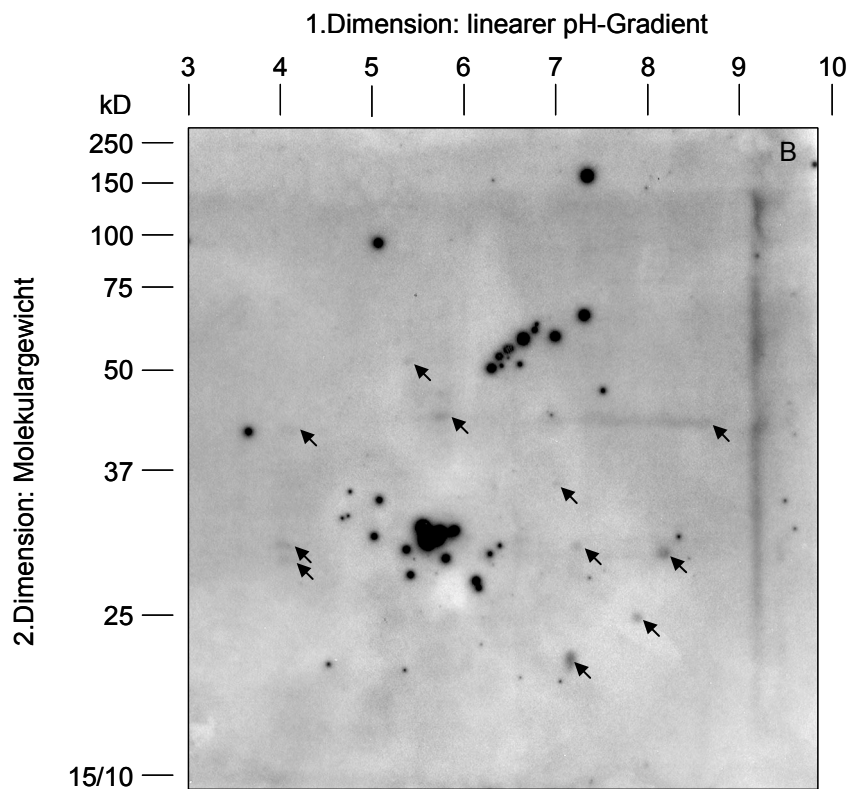


Abbildung 64: Audioradiographie zu 2D-VOPBA mit K562-Gesamtlysate (1 mg Protein). BioMax MS-Film, Audioradiographie der PVDF-Membran nach Inkubation mit 13 pmol  $^{125}$ I-VP2-Kapsid in 100 ml Renaturierungspuffer, 4 h bei RT. Die Pfeile markieren detektierte Proteinbanden. Die dominanten, runden schwarzen Flecke sind unspezifische Artefakte der Kapsidinkubation.

Im 2D-VOPBA konnten keine Proteinbanden größer 50 kD nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Renaturierung aus den stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen unzureichend, insbesondere, wenn es sich um membranassoziierte Proteine mit großen hydro-



phoben Domänen handelt. Um Kapsid-bindende Proteine durch Sequenzierung näher charakterisieren zu können, müssen die Versuchsbedingungen für die 2D-Auftrennung weiter optimiert werden. So kann die isoelektrische Fokussierung in engeren pH-Bereichen durchgeführt werden.

SDS und Harnstoff bewirken die Denaturierung von Proteinen und dabei üblicherweise die Dissoziation von Oligomeren in ihre Untereinheiten. Sie führen daher zum Verlust enzymatischer Funktionen und biologischer Eigenschaften. Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen ermöglicht die Separierung der Proteine nach ihren „nativen“ Charakteristika, wie Größe, Form und Ladung. Möglicherweise sind für die Bindung der rekombinanten B19-Kapside Oligomere oder Ladungsisomere entscheidend. Das *Bovine Parvovirus* erkennt zum Beispiel das Glycophorin A, ein Homodimer (Thacker & Johnson, 1998).

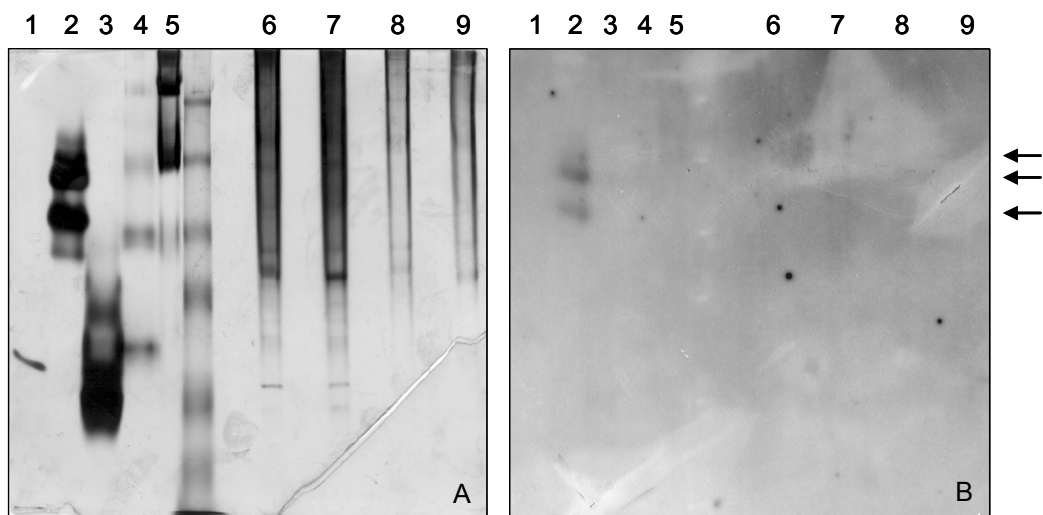


Abbildung 65: Native diskontinuierliche Gelelektrophorese. Bild (A) 7,5 % PAA-Gel, silbergefärbt und (B) Autoradiographie der PVDF-Membran nach Inkubation mit ca. 13 pmol VP2-Kapsid in 100 ml Renaturierungspuffer, 4 h bei RT. Spur (1) 10 µg  $\alpha$ -Lactalbumin aus Rindermilch, (2) Carboanhydrase aus Rindererythrocyten, (3) Albumin aus Hühnerei, (4) BSA, (5) Urease aus Bohnen und Membranproteinfraktionen (je 50 µg Protein) aus (6) MB-02-, (7) 3 d EPO-stimulierten MB-02-, (8) HeLa S3- und (9) K562-Zellen.

Nach Auftrennung der Membranproteinfraktionen unter nativen Bedingungen konnte keine Bindung von VP2-Kapsiden an Protein der getesteten Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 40). Wahrscheinlich war die Solubilisierung membran-assoziiierter und anderer hydrophober Proteine unzureichend. Die geringen separierten Proteinkonzentrationen wurden im Silbergel deutlich. In weiteren Experimenten könnten den Membranproteinfraktionen geringe Konzentrationen nicht-ionischer Detergenzien oder Harnstoff zur besseren Proteinsolubi-

lisierung zugesetzt werden (Schägger, 1994). Auffällig war die starke Bindung radioaktiv-markierter VP2-Kapside an alle Ladungs-Isoformen ( $R_f=0,284$ ,  $0,324$  und  $0,396$ ) der löslichen Carboanhydrase (29 kD) aus Rindererythrocyten. Der Vergleich dieser Banden mit den kaum sichtbaren Banden der Ladungsisomere von Hühnerei-Albumin ( $R_f=0,68$  und  $0,786$ ) läßt auf eine spezifische Bindung der Kapside an Carboanhydrase schließen.

Carboanhydrasen (CA) sind eine Familie Zink-bindender Metalloenzyme, die die Reaktion  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  katalysieren. Neun Säugetier-Isoenzyme mit variierender Aktivität, Gewebespezifität und physiologischer Bedeutung wurden identifiziert. Das Enzym spielt eine Rolle bei der Erhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichtes, beim  $\text{CO}_2$ - und Ionen-Transport, der Atmung, der Generierung von Körperflüssigkeit, der Knochenresorption, der Urogenese, der Glucogenese und der Lipogenese (Mori *et al.*, 1999). Die für Carboanhydrase beschriebenen Molekulargewichtsgrößen zwischen 30 und 55 kD korrelieren mit den in den VOPBA-Experimenten auffälligen Proteinbanden. In Erythrocyten sind vier Isoformen der Carboanhydrase lokalisiert. Neben den cytosolischen CA I, II (pI 7,3) und III wurde eine an der äußeren Oberfläche humaner Erythrocyten lokalisierte, über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Membran assoziierte humane CA IV identifiziert. Das Molekulargewicht des nativen Proteins beträgt ungefähr 55 kD, wird aber nach Inkubation mit Triton X-100 zu 45 kD transformiert. Die cytosolische CA II erscheint besonders interessant, weil ein ungefähr 30 kD-großes Protein mit einem pI von circa 7,2 in den zwei-dimensionalen Assays detektiert wurde. Möglicherweise ist diese Carboanhydrase-Isoform mit einem Glycolipid assoziiert (Wistrand *et al.*, 1999). Die CA IV aus humanen Nierenzellen ist ein 35 kD-Protein (Baird, Jr. *et al.*, 1997). Carboanhydrase könnte somit ein lohnendes Ziel für Parvovirus B19-Interaktionsstudien darstellen.

Alle in den oben dargestellten Experimenten identifizierten Proteinbanden waren nicht zelltyp-spezifisch und nicht differenzierungsabhängig und sind daher wahrscheinlich nicht direkt am Tropismus beteiligt. Differenzierungsstadien-abhängige Proteine, die die Permissivität von EPO-induzierten MB-02 erklären könnten, wurden weder in den entsprechenden Membranproteinfraktionen noch in den Gesamt-Zellysaten gefunden. Das Problem liegt möglicherweise in einem zu geringen Anteil permissiver Zellen nach 3 bzw. 5 Tagen Stimulation mit Erythropoietin. Nach Munshi *et al.* erreichen die MB-02-Zellen erst nach 5 Tagen das permissive Stadium früher primitiver Erythroblasten (Munshi *et al.*, 1993). Ein Rezeptor-Screening in Membranproteinextrakten von MB-02, die länger als 5 Tage mit EPO stimuliert wurden, könnte möglicherweise zur Identifikation von Permissivität-vermittelnden Proteinen führen. Alle gezeigten Interaktionen müssen nicht notwendigerweise in die Rezeptorbindung an der Zielzelle involviert sein, sondern können auch intrazelluläre Interaktionspartner der Kapsidproteine darstellen. Das hier durchgeführte globale Screening nach möglichen Parvovirus B19-Bindeproteinen lieferte Hinweise auf spezifische Interaktionen und sollte daher als Ausgangspunkt für



weitere, detailliertere Untersuchungen mit dem Ziel der genauen Identitätsbestimmung der Kapsid-bindenden Proteine verstanden werden. Optimierungsmöglichkeiten innerhalb der Versuchsdurchführung bestehen sowohl im Bereich der Membranproteinanreicherung als auch der gelelektrophoretischen Auftrennung der Membranproteine.

### 4.5 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick

Das humanpathogene Parvovirus B19 gehört mit ungefähr 260 Å Durchmesser zu den kleinsten bekannten Viren. Nur wenig ist über die Infektions- und Pathogenesemechanismen des Virus, zum Beispiel über die molekularen Grundlagen seines ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen, bekannt. 1993 wurde Globosid, ein Glycosphingolipid, aufgrund von Häm-agglutinationsuntersuchungen als zellulärer Rezeptor für Parvovirus B19 vorgeschlagen (Brown *et al.*, 1993).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels unabhängiger direkter, hochsensitiver Nachweistechiken (Festphasen-Bindungstests auf Basis fluoreszenz-markierter Liposomen oder radioaktiv-markierter Kapside, Oberflächenplasmonresonanz-Messungen an immobilisierten Lipidschichten, Mikrokalorimetrie) keine Hinweise für eine spezifische Parvovirus B19 / Globosid-Interaktion gefunden. Da die Art der Präsentation des spezifischen Rezeptorepitops Einfluß auf die Erkennung und Zugänglichkeit des Rezeptormoleküls durch das bindende Protein haben kann (Arab & Lingwood, 1996; Liang *et al.*, 1997), wurde die Glycolipidpräsentation von reinen Globosidschichten bis zur Integration des Glycolipids in Membranen an fester Phasen oder in Form von Liposomen variiert. Dies hatte jedoch keine Auswirkung auf das Ergebnis. Hämagglutinationsuntersuchungen aus dieser Arbeit bestätigten die in der Literatur beschriebene Hemmaktivität von Globosid, zeigten aber auch, daß die Hemmaktivität des strukturell verwandten Globopentaosylceramid der von Globosid vergleichbar ist und stellten die postulierte Spezifität des Globosid-Kapsid-Kontaktes in Frage.

Cooling *et al.* analysierten die neutrale Glycosphingolipidfraktion aus sechzehn verschiedenen humanen Geweben mittels Dünnschichtchromatographie und Immunmarkierung. Dabei wurde gezeigt, daß Globosid das neutrale Hauptglycosphingolipid in elf Gewebstypen, insbesondere in denen mesodermalen Ursprungs ist. Die Bindung rekombinanter B19-Kapside an Globosid, SSEA-3, SSEA-4 und Paraglobosid (Neolactotetraglycosylceramid) und zahlreiche nicht-identifizierte Glycolipide aus Erythrocyten, Granulocyten, Nieren- oder Leberzellen wurde in diesen Untersuchungen mittels eines VP2-spezifischen, allerdings nicht konformationsspezifischen Antikörpers detektiert. Die Autoren verweisen auf die mögliche Existenz eines Corezeptors, der den ausgeprägten Tropismus für erythroide Vorläuferzellen vermittelt (Cooling *et al.*, 1995). Die Bindung von Proteinkapsiden an zahlreiche, auch strukturell nicht-verwandte Glycolipide stellt die spezifische Globosiderkennung in Frage, insbesondere da die Kapsidbindung an nLc4Cer

(Paraglobosid) gezeigt wurde. Paraglobosid sollte eigentlich, ebenso wie asialo-Gangliosid<sub>GM1</sub>, eine geeignete Negativkontrolle zur Globosiderkennung mit vergleichbaren physiko-chemischen Eigenschaften darstellen, weil der Kohlenhydratanteil dem von Globosid zwar ähnelt, die terminale Zuckersequenz jedoch invertiert ist; es wird aber von VP2-Kapsiden erkannt. Paraglobosid ist auf Erythrocyten des p-Phänotyps in abnormen Mengen präsent (Bailly & Bouhours, 1995). Erythrocyten dieses Phänotyps werden jedoch nicht durch Parvovirus B19 hämagglutiniert (Brown *et al.*, 1993). Sind die Hämagglutinationsaktivität und die Rezeptorerkennung durch B19-Viruspartikeln folglich voneinander unabhängig? Die Entkopplung von Hämagglutinationsaktivität und Infektiosität wurde für CPV gezeigt. Eine nicht-hämagglutinierende CPV-Mutante konnte in Zellkultur feline und canine Zellen infizieren und in ihnen replizieren (Parrish *et al.*, 1988). Eine Rolle der für die Hämagglutination wichtigen Sialinsäurebindung innerhalb des Virus-Wirtszell-Kontaktes konnte nicht nachgewiesen werden (Barbis *et al.*, 1992). Allerdings liegen die für die Infektiosität notwendige Calciumbindestelle und die pH-Abhängigkeit der HA vermittelnden Strukturdomänen innerhalb der gleichen Oberflächenstruktur des Virus (Simpson *et al.*, 2000). Neueste Untersuchungen zeigen, daß CPV und FPV humane und feline Transferrin-Rezeptoren zur Bindung an die Zelle, zum Zelleintritt und zur Infektion der Zelle nutzen (Parker *et al.*, 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der klinischen Beobachtung, daß Individuen, die kein Globosid exprimieren, nicht durch Parvovirus B19 infizierbar sind (Brown *et al.*, 1994) und gehen nur teilweise mit publizierten Hämagglutinationsdaten konform. Sie lassen daher vermuten, daß Globosid im Membrankontext nicht als einzelner, direkter Rezeptor von Parvovirus B19 agieren kann, aber vielleicht in Zusammenhang einer Interaktion des Virus mit einem anderen Rezeptormolekül erkannt wird. Ein Komplex des Rezeptormoleküls mit Globosid und daraus folgende konformationelle Änderungen eines oder mehrerer Rezeptormoleküle sind denkbare Voraussetzung für die Virusbindung. Offenbar ist die Affinität des reinen Kapsid / Globosid-Kontaktes in Abwesenheit eines solchen sekundären Rezeptors nicht groß genug, um den Nachweis der Bindung in dieser Arbeit zu gewährleisten.

Eine Interaktion mit Globosid als einzigem Rezeptor kann nicht den ausgeprägten Zelltropismus von Parvovirus B19 erklären. Das P-Antigen Globosid ist nicht nur auf Erythrocyten und deren Vorläufern präsent, sondern auch auf einer Vielzahl weiterer Zelltypen, in denen B19 nicht repliziert. Die Daten dieser Arbeit korrelieren auch mit neuesten Untersuchungen zur Transduktion humaner hämatopoetischer Zellen mit einem rekombinanten Parvovirus B19-Vektor, die vermuten lassen, daß Globosid in die Bindung von Parvovirus B19 involviert ist, aber die Effizienz der viralen Bindung nicht von der Konzentration des P-Antigens auf der Zelloberfläche abhängt. Globosid war notwendig, aber nicht ausreichend für die Zellinfektion, daher wurde

auch hier die Existenz eines zellulären Corezeptors für den effizienten Eintritt des Virus in die humane Zelle postuliert (Ponnazhagan *et al.*, 1998; Weigel-Kelley *et al.*, 2001).

Die polyvalente Bindung von Rezeptormolekülen kann die Avidität eines Viruskontaktes stark erhöhen (Haywood, 1994; Norkin, 1995; Lee & Lee, 1995). Neben der für polyvalente Kontakte minimal notwendigen Dichte der Rezeptormoleküle können sekundäre Interaktionen bei hohen Rezeptordichten einen Wechsel der Kohlenhydrat-Bindungsselektivität verursachen. Interaktionen der Oligosaccharidstrukturen untereinander können die individuelle Bindungsreaktion mit einem Protein beeinflussen. Zudem könnten Protein-Protein-Kontakte bei hohen Kohlenhydrat-Oberflächendichten etabliert werden, deren Spezifität abhängig von der Art des Kohlenhydrat-liganden sein kann (Horan *et al.*, 1999). Die Cryptizität eines Rezeptors ist entscheidend für eine spezifische Protein / Rezeptor-Interaktion. Globotetraose wird zum Beispiel in unterschiedlich differenzierten Erythrocyten verschieden präsentiert, sie ist für  $\alpha$ -Gb4-Antikörper auf der Oberfläche adulter Erythrocyten im Vergleich zu fötalen Erythrocyten schwer zugänglich (Hakomori, 1981). Der Tropismus von Parvovirus B19 kann daher durch verschiedene Faktoren vermittelt werden. So kann die Permissivität der Zelle abhängig von der Differenzierungs- und zelltypspezifischen Globosidkonzentration und –zugänglichkeit im Zusammenspiel mit dem Vorhandensein eines weiteren konstitutiven Rezeptormoleküls oder spezifischen Rezeptormoleküls in permissiven Zellen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch erste Untersuchungen zur Identifizierung anderer Rezeptormoleküle in Membranproteinfraktionen von permissiven und nicht-permissiven humanen Zelllinien auf Basis eines *Virus overlay protein binding*-Assays durchgeführt. Die Inkubation gelelektrophoretisch aufgetrennter und an PVDF-Membranen immobilisierter Zellmembranproteine mit  $^{125}$ I-markierten Proteinkapsiden führte zur Detektion mehrerer, wahrscheinlich nicht-zelltypspezifischer Proteinbanden im Bereich von 30 bis 100 kD, deren Identität noch unklar ist. Einziger identifizierter Interaktionspartner der VP2-Proteinkapside war gereinigte Carboanhydrase aus Rindererythrocyten. Die Spezifität dieser Bindung muß jedoch in weiteren Experimenten nachgewiesen werden.

In zukünftigen, weiterführenden Untersuchungen zur Rezeptor / Proteinkapsid-Wechselwirkung wäre eine breite Variation der Rezeptordichte im Biosensorassay oder die gleichzeitige Präsentation anderer Rezeptormoleküle, wie zum Beispiel von membran-assoziiierter Carboanhydrase, anzustreben. Die direkten Bindungsstudien sollten bei niedrigeren Temperaturen (4°C) wiederholt werden, um mögliche niedrigaffine Bindungen mit einem schnellen Bindungs-Dissoziations-Gleichgewicht kinetisch zu verlangsamen und damit vielleicht den Nachweis eines spezifischen Kontaktes zwischen Glycolipiden und B19 Proteinkapsiden zu ermöglichen. Die Proteinkomponenten aus den Rezeptor-Screening-Experimenten sollten im weiteren näher charakterisiert und dann in die Rezeptorbindungsstudien integriert werden.

## 5 Literaturverzeichnis

Agbandje, M., Kajigaya, S., McKenna, R., Young, N. S. und Rossmann, M. G. (1994): The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* 203(1), 106-115.

Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M. G., Kajigaya, S. und Young, N. S. (1991): Preliminary X-ray crystallographic investigation of human parvovirus B19. *Virology* 184(1), 170-174.

Anderson, M. J., Jones, S. E., Fisher, H. S., Lewis, E., Hall, S. M., Bartlett, C. L., Cohen, B. J., Mortimer, P. P. und Pereira, M. S. (1983): Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? [letter]. *Lancet* 1(8338), 1378.

Arab, S. & Lingwood, C. A. (1996): Influence of phospholipid chain length on verotoxin/globotriaosyl ceramide binding in model membranes: comparison of a supported bilayer film and liposomes. *Glycoconj.J.* 13(2), 159-166.

Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1985): Calculation of the partial specific volume of proteins in concentrated salt and amino acid solutions. *Methods Enzymol.* 117, 60-65.

Astell, C. R., Thomson, M., Merchlinsky, M. und Ward, D. C. (1983): The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* 11(4), 999-1018.

Bailly, P. & Bouhours, J. F. (1995): P Blood Group and Related Antigens. In *Molecular Basis of Major Human Blood Group Antigens, Blood Cell Biochemistry* (J. P. Cartron, Rouger und P., Eds.). Plenum Press, New York.

Baird, T. T., Jr., Waheed, A., Okuyama, T., Sly, W. S. und Fierke, C. A. (1997): Catalysis and inhibition of human carbonic anhydrase IV. *Biochemistry* 36(9), 2669-2678.

Bansal, G. P., Hatfield, J. A., Dunn, F. E., Kramer, A. A., Brady, F., Riggin, C. H., Collett, M. S., Yoshimoto, K., Kajigaya, S. und Young, N. S. (1993): Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J.Infect.Dis.* 167(5), 1034-1044.

Barbis, D. P., Chang, S. F. und Parrish, C. R. (1992): Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* 191(1), 301-308.

Barbis, D. P. & Parrish, C. R. (1994): Characterization of canine parvovirus (CPV) interactions with 3201 T cells: involvement of GPI-anchored protein(s) in binding and infection. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 27(2), 401-407.

Basak, S., Turner, H. und Parr, S. (1994): Identification of a 40- to 42-kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells. *Virology* 205(1), 7-16.

Baxa, U., Cooper, A., Weintraub, A., Pfeil, W. und Seckler, R. (2001): Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* 40(17), 5144-5150.

Bishop, N. E. & Anderson, D. A. (1997): Early interactions of hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch.Virol.* 142(11), 2161-2178.

- Blundell, M. C., Beard, C. und Astell, C. R. (1987): In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology* 157(2), 534-538.
- Brown, C. S., Van-Lent, J. W., Vlak, J. M. und Spaan, W. J. (1991): Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J.Virol.* 65(5), 2702-2706.
- Brown, K. E., Anderson, S. M. und Young, N. S. (1993): Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262(5130), 114-117.
- Brown, K. E. & Cohen, B. J. (1992): Haemagglutination by parvovirus B19. *J.Gen.Virol.* 73 ( Pt 8), 2147-2149.
- Brown, K. E., Hibbs, J. R., Gallinella, G., Anderson, S. M., Lehman, E. D., McCarthy, P. und Young, N. S. (1994): Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N.Engl.J.Med.* 330(17), 1192-1196.
- Brown, K. E. & Young, N. S. (1997): Human parvovirus B19: Pathogenesis of disease. In *Monographs in Virology* (Anderson, L. J. and Young, N. S., Eds.). Karger, Basel.
- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991): Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli. *Biotechnology N.Y.* 9(2), 157-162.
- Carroll, S. M., Higa, H. H. und Paulson, J. C. (1981): Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins. *J.Biol.Chem.* 256(16), 8357-8363.
- Caspar, D. L. D. & Klug, A. (1962): Physical Principles in the Construction of Regular Viruses. *Cold Spring Harb. Symp.Quant.Biol.* 27, 1-24.
- Chipman, P. R., Agbandje-McKenna, M., Kajigaya, S., Brown, K. E., Young, N. S., Baker, T. S. und Rossmann, M. G. (1996): Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93(15), 7502-7506.
- Cohn, E. J. & Edsall, J. T. (1943): *Proteins, Amino acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions*. Reinhold Publishing Corporation, New York.
- Cooling, L. L., Koerner, T. A. und Naides, S. J. (1995): Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J.Infect.Dis.* 172(5), 1198-1205.
- Cooper, M. A., Hansson, A., Lofas, S. und Williams, D. H. (2000): A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal.Biochem.* 277(2), 196-205.
- Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B. und Widdows, D. (1975): Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1(7898), 72-73.
- CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data* (1999) 79.Ed. (Lide, D. R., Ed.), CRC Press, Washington D.C.
- de Verdugo, U. R., Selinka, H. C., Huber, M., Kramer, B., Kellermann, J., Hofschneider, P. H. und Kandolf, R. (1995): Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J.Virol.* 69(11), 6751-6757.

dem Borne, A. E., Bos, M. J., Joustra-Maas, N., Tromp, J. F., van't Veer, M. B., Wijngaarden-du, B. R. und Tetteroo, P. A. (1986): A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br.J.Haematol.* 63(1), 35-46.

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic.Acids.Res.* 16(13), 6127-6145.

Ebenbichler, C. F., Stoiber, H., Schneider, R., Patsch, J. R. und Dierich, M. P. (1996): The human immunodeficiency virus type 1 transmembrane gp41 protein is a calcium-binding protein and interacts with the putative second-receptor molecules in a calcium-dependent manner. *J.Virol.* 70(3), 1723-1728.

Erb, E. M., Chen, X., Allen, S., Roberts, C. J., Tendler, S. J., Davies, M. C. und Forsen, S. (2000): Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip. *Anal.Biochem.* 280(1), 29-35.

Esser, P. (2001): Bulletin 6: Principles in Adsorption to Polystyrene. <http://nunc.nalgenunc.com> .

Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L. und Gonzalez-Scarano, F. (1993): Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90(7), 2700-2704.

Fantini, J., Hammache, D., Pieroni, G. und Yahi, N. (2000): Role of glycosphingolipid microdomains in CD4-dependent HIV-1 fusion. *Glycoconj.J.* 17(3 -4), 199-204.

Fisher, A. J., McKinney, B. R., Schneemann, A., Rueckert, R. R. und Johnson, J. E. (1993): Crystallization of viruslike particles assembled from flock house virus coat protein expressed in a baculovirus system. *J.Virol.* 67(5), 2950-2953.

Fox, J. M. & Bloom, M. E. (1999): Identification of a cell surface protein from Crandell feline kidney cells that specifically binds Aleutian mink disease parvovirus. *J.Virol.* 73(5), 3835-3842.

Gareus, R., Gigler, A., Hemauer, A., Leruez, V. M., Morinet, F., Wolf, H. und Modrow, S. (1998): Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J.Virol.* 72(1), 609-616.

Gigler, A., Dorsch, S., Hemauer, A., Williams, C., Kim, S., Young, N. S., Zolla-Pazner, S., Wolf, H., Gorny, M. K. und Modrow, S. (1999): Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *J.Virol.* 73(3), 1974-1979.

Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.* 182(2), 319-326.

Görg, A., Postel, W., Günther, S. und Weser, J. (1985): Improved horizontal Two dimensional electrophoresis which hybrid Isoelectric Focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-an transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6, 599-604.

Haataja, S., Tikkanen, K., Liukkonen, J., Francois-Gerard, C. und Finne, J. (1993): Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J.Biol.Chem.* 268(6), 4311-4317.

Hakomori, S. (1981): Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu.Rev.Biochem.* 50, 733-764.

Haywood, A. M. (1994): Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J.Virol.* 68(1), 1-5.

- Hicks, K. E., Cubel, R. C., Cohen, B. J. und Clewley, J. P. (1996): Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. *Arch.Virol.* 141(7), 1319-1327.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1), 51-59.
- Horan, N., Yan, L., Isobe, H., Whitesides, G. M. und Kahne, D. (1999): Nonstatistical binding of a protein to clustered carbohydrates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96(21), 11782-11786.
- Jaenicke, R., Rudolph, R. und Heider, I. (1981): Specificity in the Subunit Assembly of Oligomeric Enzymes. *Biochem.Int.* 2, 23-31.
- Jindal, H. K., Yong, C. B., Wilson, G. M., Tam, P. und Astell, C. R. (1994): Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA heliase functions. *J.Biol.Chem.* 269(5), 3283-3289.
- Johnson, R. H., Siegl, G. und Gautschi, M. (1974): Characteristics of feline panleucopaenia virus strains enabling definitive classification as parvoviruses. *Arch.Gesamte Virusforsch.* 46(3-4), 315-324.
- Jones, D. H., Lingwood, C. A., Barber, K. R. und Grant, C. W. (1997): Globoside as a membrane receptor: a consideration of oligosaccharide communication with the hydrophobic domain. *Biochemistry* 36(28), 8539-8547.
- Jordan, J. A. & DeLoia, J. A. (1999): Globoside expression within the human placenta. *Placenta* 20(1), 103-108.
- Kajigaya, S., Fujii, H., Field, A., Anderson, S., Rosenfeld, S., Anderson, L. J., Shimada, T. und Young, N. S. (1991): Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88(11), 4646-4650.
- Kajigaya, S., Shimada, T., Fujita, S. und Young, N. S. (1989): A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86(19), 7601-7605.
- Kannagi, R., Levery, S. B., Ishigami, F., Hakomori, S., Shevinsky, L. H., Knowles, B. B. und Solter, D. (1983): New globoseries glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, stage-specific embryonic antigen 3. *J.Biol.Chem.* 258(14), 8934-8942.
- Kawase, M., Momoeda, M., Young, N. S. und Kajigaya, S. (1995): Modest truncation of the major capsid protein abrogates B19 parvovirus capsid formation. *J.Virol.* 69(10), 6567-6571.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. und Buchner, J. (1991): Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N.Y.)* 9(9), 825-829.
- Koch, W. C. (1995): A synthetic parvovirus B19 capsid protein can replace viral antigen in antibody-capture enzyme immunoassays. *J.Virol.Methods* 55(1), 67-82.
- Kunz, C. & Rudloff, S. (1996): [Structural and functional aspects of oligosaccharides in human milk]. *Z.Ernahrungswiss.* 35(1), 22-31.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680-685.

- Latimer, P. (1967): Absolute absorption and scattering spectrophotometry. *Arch.Biochem.Biophys.* 119(1), 580-581.
- Lee, Y. C. & Lee, R. T. (1995): Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc.Chem.Res.* 28(8), 322-327.
- Liang, R., Loebach, J., Horan, N., Ge, M., Thompson, C., Yan, L. und Kahne, D. (1997): Polyvalent binding to carbohydrates immobilized on an insoluble resin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94(20), 10554-10559.
- Liu, J. M., Fujii, H., Green, S. W., Komatsu, N., Young, N. S. und Shimada, T. (1991): Indiscriminate activity from the B19 parvovirus p6 promoter in nonpermissive cells. *Virology* 182(1), 361-364.
- Liu, J. M., Green, S. W., Shimada, T. und Young, N. S. (1992): A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J.Virol.* 66(8), 4686-4692.
- Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G. und Feliu, A. S. (1981): A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 166(4), 546-550.
- Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. (1975): Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45(3), 321-334.
- Mammen, M., Choi, S.-K. und Whitesides, G. M. (1998): Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angew.Chem.* 110, 2908-2953.
- Marcus, D. M., Kundu, S. K. und Suzuki, A. (1981): The P blood group system: recent progress in immunochemistry and genetics. *Semin.Hematol.* 18(1), 63-71.
- Mastromarino, P., Cioe, L., Rieti, S. und Orsi, N. (1990): Role of membrane phospholipids and glycolipids in the Vero cell surface receptor for rubella virus. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 179(2), 105-114.
- Matrosovich, M., Miller-Podraza, H., Teneberg, S., Robertson, J. und Karlsson, K. A. (1996): Influenza viruses display high-affinity binding to human polyglycosylceramides represented on a solid-phase assay surface. *Virology* 223(2), 413-416.
- Meier, M., Bider, M. D., Malashkevich, V. N., Spiess, M. und Burkhard, P. (2000): Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J.Mol.Biol.* 300(4), 857-865.
- Modrow, S. (2001): Parvovirus B19. *Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen* Jg.98(24), C1293-C1297.
- Moffatt, S., Yaegashi, N., Tada, K., Tanaka, N. und Sugamura, K. (1998): Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J.Virol.* 72(4), 3018-3028.
- Momoeda, M., Wong, S., Kawase, M., Young, N. S. und Kajigaya, S. (1994): A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J.Virol.* 68(12), 8443-8446.
- Morey, A. L., Ferguson, D. J. und Fleming, K. A. (1993): Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. *J.Pathol.* 169(2), 213-220.



- Morey, A. L. & Fleming, K. A. (1992): Immunophenotyping of fetal haemopoietic cells permissive for human parvovirus B19 replication in vitro. *Br.J.Haematol.* 82(2), 302-309.
- Morey, A. L., Keeling, J. W., Porter, H. J. und Fleming, K. A. (1992): Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 99, 566-574.
- Morgan, D. A., Gumucio, D. L. und Brodsky, I. (1991): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent growth and erythropoietin-induced differentiation of a human cell line MB-02. *Blood* 78(11), 2860-2871.
- Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I. und Nakao, K. (1999): Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J.Biol.Chem.* 274(22), 15701-15705.
- Morinet, F., D'Auriol, L., Tratschin, J. D. und Galibert, F. (1989): Expression of the human parvovirus B19 protein fused to protein A in *Escherichia coli*: recognition by IgM and IgG antibodies in human sera. *J.Gen.Virol.* 70(Pt 11), 3091-3097.
- Mortimer, P. P., Humphries, R. K., Moore, J. G., Purcell, R. H. und Young, N. S. (1983): A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature* 302(5907), 426-429.
- Munshi, N. C., Zhou, S., Woody, M. J., Morgan, D. A. und Srivastava, A. (1993): Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *J.Virol.* 67(1), 562-566.
- Naiki, M. & Marcus, D. M. (1974): Human erythrocyte P and Pk blood group antigens: identification as glycosphingolipids. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 60(3), 1105-1111.
- Naiki, M. & Marcus, D. M. (1975): An immunochemical study of the human blood group P1, P, and PK glycosphingolipid antigens. *Biochemistry* 14(22), 4837-4841.
- Norkin, L. C. (1995): Virus receptors: implications for pathogenesis and the design of antiviral agents. *Clin.Microbiol.Rev.* 8(2), 293-315.
- O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250(10), 4007-4021.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. und Luckow, V. A. (1992): *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*. W.H.Freeman and Company, New York.
- O'Sullivan, M. G., Anderson, D. C., Fikes, J. D., Bain, F. T., Carlson, C. S., Green, S. W., Young, N. S. und Brown, K. E. (1994): Identification of a novel simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection. *J.Clin.Invest* 93(4), 1571-1576.
- Ooi, B. G., Rankin, C. und Miller, L. K. (1989): Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J.Mol.Biol.* 210(4), 721-736.
- Ozawa, K., Ayub, J., Hao, Y. S., Kurtzman, G., Shimada, T. und Young, N. (1987): Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J.Virol.* 61(8), 2395-2406.
- Ozawa, K., Ayub, J., Kajigaya, S., Shimada, T. und Young, N. (1988a): The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J.Virol.* 62(8), 2884-2889.

- Ozawa, K., Ayub, J. und Young, N. (1988b): Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets. *J.Biol.Chem.* 263(22), 10922-10926.
- Ozawa, K., Kurtzman, G. und Young, N. (1986): Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* 233(4766), 883-886.
- Pace, C. N. (1986): Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131, 266-280.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4(11), 2411-2423.
- Pallier, C., Greco, A., Le-Junter, J., Saib, A., Vassias, I. und Morinet, F. (1997): The 3' untranslated region of the B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells. *J.Virol.* 71(12), 9482-9489.
- Parker, J. S., Murphy, W. J., Wang, D., O'Brien, S. J. und Parrish, C. R. (2001): Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells. *J.Virol.* 75(8), 3896-3902.
- Parrish, C. R., Burtonboy, G. und Carmichael, L. E. (1988): Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. *Virology* 163(1), 230-232.
- Pietropaolo, R. & Compton, T. (1999): Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. *J.Gen.Virol.* 80 ( Pt 7), 1807-1816.
- Ponnazhagan, S., Weigel, K. A., Raikwar, S. P., Mukherjee, P., Yoder, M. C. und Srivastava, A. (1998): Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythroid cell-specific delivery and expression of transduced genes. *J.Virol.* 72(6), 5224-5230.
- Puck, T. T., Marcus, P. I. und Cieciura, S. J. (1956): *J.Exp.Med.* 103, 273-284.
- Puri, A., Hug, P., Jernigan, K., Rose, P. und Blumenthal, R. (1999): Role of glycosphingolipids in HIV-1 entry: requirement of globotriosylceramide (Gb3) in CD4/CXCR4-dependent fusion. *Biosci.Rep.* 19(4), 317-325.
- Rayment, F. B., Crosdale, E., Morris, D. J., Pattison, J. R., Talbot, P. und Clare, J. J. (1990): The production of human parvovirus capsid proteins in *Escherichia coli* and their potential as diagnostic antigens. *J.Gen.Virol.* 71 ( Pt 11), 2665-2672.
- Rogers, G. N., Paulson, J. C., Daniels, R. S., Skehel, J. J., Wilson, I. A. und Wiley, D. C. (1983): Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 304(5921), 76-78.
- Rosenfeld, S. J., Yoshimoto, K., Kajigaya, S., Anderson, S., Young, N. S., Field, A., Warrenner, P., Bansal, G. und Collett, M. S. (1992): Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J.Clin.Invest* 89(6), 2023-2029.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996): In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10(1), 49-56.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1997): In vitro-Faltung von Inclusion Body-Proteinen. *Nachr.Chem.Tech.Lab.* 45(7/8).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2.Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schägger, H. (1994): Native gel electrophoresis. In *A Practical Guide to Membrane Protein Purification* (Von Jagow, G. and Schägger, H., Eds.). Academic Press, San Diego.

Schmid, F. X. (1989): Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A practical Approach* (T. E. Creighton, Ed.). Oxford University Press, New York.

Schmidt, U. (2000): Untersuchungen von Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Schneider-Schaulies, J. (2000): Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J.Gen.Virol.* 81 Pt 6, 1413-1429.

Schwarz, T. F., Modrow, S., Hottentrager, B., Hoflacher, B., Jager, G., Scharti, W., Sumazaki, R., Wolf, H., Middeldorp, J., Roggendorf, M. und . (1991): New oligopeptide immunoglobulin G test for human parvovirus B19 antibodies. *J.Clin.Microbiol.* 29(3), 431-435.

Serke, S., Schwarz, T. F., Baurmann, H., Kirsch, A., Hottentrager, B., von-Brunn, A., Roggendorf, M., Huhn, D. und Deinhardt, F. (1991): Productive infection of in vitro generated haemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood with parvovirus B19: studies by morphology, immunocytochemistry, flow-cytometry and DNA-hybridization. *Br.J.Haematol.* 79(1), 6-13.

Shade, R. O., Blundell, M. C., Cotmore, S. F., Tattersall, P. und Astell, C. R. (1986): Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J.Virol.* 58(3), 921-936.

Shimomura, S., Komatsu, N., Frickhofen, N., Anderson, S., Kajigaya, S. und Young, N. S. (1992): First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood* 79(1), 18-24.

Simpson, A. A., Chandrasekar, V., Hebert, B., Sullivan, G. M., Rossmann, M. G. und Parrish, C. R. (2000): Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *J.Mol.Biol.* 300(3), 597-610.

Simpson, A. A., Chipman, P. R., Baker, T. S., Tijssen, P. und Rossmann, M. G. (1998): The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. *Structure.* 6(11), 1355-1367.

Spear, P. G., Eisenberg, R. J. und Cohen, G. H. (2000): Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275(1), 1-8.

Srivastava, A., Bruno, E., Briddell, R., Cooper, R., Srivastava, C., van Besien, K. und Hoffman, R. (1990): Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 76(10), 1997-2004.

St Amand, J. & Astell, C. R. (1993): Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology* 192(1), 121-131.

Stehle, T. & Harrison, S. C. (1997): High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16(16), 5139-5148.

Steinbach, S., Wistuba, A., Bock, T. und Kleinschmidt, J. A. (1997): Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro. *J.Gen.Virol.* 78(Pt 6), 1453-1462.

Stray, S. J., Cummings, R. D. und Air, G. M. (2000): Influenza virus infection of desialylated cells. *Glycobiology* 10(7), 649-658.

Stroud, M. R., Stapleton, A. E. und Levery, S. B. (1998): The P histo-blood group-related glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside as a preferred binding receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: isolation and structural characterization from human kidney. *Biochemistry* 37(50), 17420-17428.

Stryer, L. (1991): *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.

Summerford, C., Bartlett, J. S. und Samulski, R. J. (1999): AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat.Med.* 5(1), 78-82.

Summerford, C. & Samulski, R. J. (1998): Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J.Virol.* 72(2), 1438-1445.

Takahashi, T., Ozawa, K., Takahashi, K., Asano, S. und Takaku, F. (1990): Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood* 75(3), 603-610.

Terrettaz, S., Stora, T., Duschl, C. und Vogel, H. (1993): Protein Binding to Supported Lipid Membranes: Investigation of the Cholera Toxin-Ganglioside Interaction by Simultaneous Impedance Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance. *Langmuir* 9, 1361-1369.

Thacker, T. C. & Johnson, F. B. (1998): Binding of bovine parvovirus to erythrocyte membrane sialoglycoproteins. *J.Gen.Virol.* 79 ( Pt 9), 2163-2169.

Thomson, G. W. & Gagnon, A. N. (1978): Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Can.Vet.J.* 19(12), 346.

Tijssen, P. & Kurstak, E. (1979): Studies on the structure of the two infectious types of denso-nucleosis virus. *Intervirology* 11(5), 261-267.

Urakawa, T., Ferguson, M., Minor, P. D., Cooper, J., Sullivan, M., Almond, J. W. und Bishop, D. H. (1989): Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector. *J.Gen.Virol.* 70 ( Pt 6), 1453-1463.

Walters, R. W., Yi, S., Keshavjee, S., Brown, K. E., Welsh, M. J., Chiorini, J. A. und Zabner, J. (2001): Binding of Adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J.Biol.Chem.*

Weigel-Kelley, K. A., Yoder, M. C. und Srivastava, A. (2001): Recombinant human parvovirus b19 vectors: erythrocyte p antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J.Virol.* 75(9), 4110-4116.

Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1988): Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333(6172), 426-431.

Wiels, J., Mangeney, M., Tetaud, C. und Tursz, T. (1991): Sequential shifts in the three major glycosphingolipid series are associated with B cell differentiation. *Int.Immunol.* 3(12), 1289-1300.

Wistrand, P. J., Carter, N. D., Conroy, C. W. und Mahieu, I. (1999): Carbonic anhydrase IV activity is localized on the exterior surface of human erythrocytes. *Acta Physiol Scand.* 165(2), 211-218.

Yaegashi, N., Shiraishi, H., Takeshita, T., Nakamura, M., Yajima, A. und Sugamura, K. (1989): Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver. *J. Virol.* 63(6), 2422-2426.

Yoo, B. C., Lee, D. H., Park, S. M., Park, J. W., Kim, C. Y., Lee, H. S., Seo, J. S., Park, K. J. und Ryu, W. S. (1999): A novel parvovirus isolated from Manchurian chipmunks. *Virology* 253(2), 250-258.

## Eigene Veröffentlichungen

### Posterpräsentationen:

**Bärbel Kaufmann**, Ulrich Baxa, Susanne Modrow, Henrik C. Hansen, Ulf Nilsson und Robert Seckler: Does Parvovirus B19 bind its receptor globoside in an oligomerized state?. 1<sup>st</sup> Parvovirus Euroconference (Event #2): Health Benefits and Risks from Parvovirus Infections. Granada (Spain), June 17-20, 1999.

Simone Dorsch, Uwe Schaible, **Bärbel Kaufmann**, Karin Beckenlehner, Andreas Gigler, Hans Wolf, Elke Prohaska und Susanne Modrow: Charakterisierung der Wechselwirkung neutralisierender, humaner, monoklonaler Antikörper mit dem VP1-Protein von Parvovirus B19 mit Hilfe eines Schwingquartz-Biosensors. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Wien, 26.-29. April, 2000.

**Bärbel Kaufmann**, Ulrich Baxa, Susanne Modrow, Henrik C. Hansen, Ulf Nilsson und Robert Seckler: Receptor Binding by Human Parvovirus B19. VIII<sup>th</sup> Parvovirus Workshop. Mont-Tremblant (Québec, Canada), June 28<sup>th</sup> – July 2<sup>nd</sup>, 2000.

**Bärbel Kaufmann**, Ulrich Baxa, Susanne Modrow, Henrik C. Hansen, Ulf Nilsson und Robert Seckler: Interaktion von Parvovirus B19 mit dem Glykolipid Globosid. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Dresden, 14.-17. März, 2001.

### Publikationen:

Simone Dorsch, **Bärbel Kaufmann**, Uwe Schaible, Elke Prohaska, Hans Wolf und Susanne Modrow: The VP1-unique region of Parvovirus B19: amino acid variability and antigenic stability. *J. Gen. Virol.* 82, 191-199, 2001.

Simone Dorsch, Gerhard Liebisch, **Bärbel Kaufmann**, Philip von Landenberg, Jörg H. Hoffmann, Wolfgang Drobnik und Susanne Modrow: The VP1-unique region of Parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity - implications for pathogenesis. eingereicht bei *J. Virol.*, 2001.

## 6 Anhang

### Plasmidsequenzen im Klonierungsbereich

#### pET11a-Derivate

#### **pET11a-VP1 (sequenzierter Bereich)**

*VP1-PCR-Template:* pcDNA3-VP1  
*VP1-codierende Sequenz:* 2346 – 1

*verwendete Sequenzierprimer:* 3B1, 3F1, 4B1, 4F1, 7B2, 8B2, 8F1, T7-prom, T7-term

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX** – Start- bzw. Stopcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....ggctttgtagcagccggatccgcgacccatttgctgtccaccagtcattgctagc

1

**TT**ACAATGGGTGCACACGGCTTTTGGCTGTCCACAATTCTTCAGGCTTTTCATATCCATGTCTGTGGTGT  
 TGTTCATCTGTAGCTGTGGGGTCATATAGTACATATGGTAAATGACCTGCTGCGTGCGGGGGATATA  
 CTCCAGGTTGAGGATTCCACCGTCCCGTAGCTTTACGGGGCCCCAATTTAAATGTCATAGTTACTGTCAT  
 AATTCCCACGGCATACTGAACCTAAGGTAGTAATTCCCATTTGATTTAATACCTCCAATTGGCCCACTTTGT  
 GGTAATATTTTTAAAAATATTTGAGGAGGTGGCTGATGCAAAACCCATCCTCCTAAGGCTGCAAACTGAG  
 TTTTAAACTGTCATCTAAATTTGGAATTTTACTCCACAGCTGGCTTTTCATAGTGAAGGGCTCTTCTGTT  
 CCATACAGAACCCACCATTAGGGGGCGCTCAATTTGATCTGTATATTGCTGGGTTCCCTTATTGGGAAAG  
 TAGGTGTGCATGTTTAAACCTGTAACTGTTTCTTTTTCATTTGGAAATCTACCCACTCCTT  
 GCTGATACTCTTTGTCTTCAGCGTTACCATAAGTGGTCTGACCATGAGAAATGGCATTTATTCCCTGTGAC  
 ATATTTATCTGTGTCCAGTGGTGGTATGGCTGAGACACTGGCCCAGGGCGTAAGGATATTCTAGTGTTT

701

TGAGAGGTACCTGTGCTAAGGCCTGTTAAGGCTTTTCCAGCTCCAGTATTAGAGCTGTCTCCCTCCTTTG  
 TAGACACTGAGTTTACTAGTGGCCCTGGCATGAAGTTTTGGGGCTGAATTGCATGGTCTTCATGTGTTAA  
 AGATCTAAATTTTGGGTCACCTCCTAATGTGTCAGGAACCCCTAAGCGGGATCCGTATAAGGGCTTGTAC  
 ATTTTCATAAAAGTGTTGACTGCAGCCCTCTAAATTTCTGGGGGCACTGGAGGAACTTATAAGACATAG  
**TT**GTGCTGACCTCCTGTACCTAAAAGCTGAAAAGAACTGTGTTCCAAAACATAAAATGCTGATTCTTCACT  
 TGCTAATTTTTTGTGCTCTCCAGAAATTCCTTGTGTGTTAACATCTCCTACTGTTAAGTAAGCATATTGA  
 GGGGGAAAGTATACCCAAATAGGAAGTTCTGGGGCTAAAGTATCCTGACCTTGCCCTAACACATATGGGT

ACTTGTATTCATGGTCTACTAACATGCATAGGCGCCCTGTAGTGCTGTCAGTAACCTGTACCCCCCTCC  
AGTTTTGTCTGTAACATCCTTAACAGCAATTTCTGATATGGTTACAGTTAAAGCATCAGGAGCTATACTT  
CCATAATTTTCAATTAAGTGCTGAACTCTAAAGGTGAAAAAATAAATTTAAAGCATTAAATCTAAAT

1401

ATCTCCATGGGGTTGAGTATCCCATTATGGGACTAATGTTGCAAACCTTTGCCTCCTTTCCACTGGCATT  
GTGGCAGCTACTTGCTGCGGGAGAAAACACCTTATAATGGTGCTCTGGGTCATATGGAATTA AAAACTGT  
CTGGAAAATGTGCAAGTTACAGAGTTGGCACTAAAAGTGGCCCCCTCACTCCACATGCTTTTGACAGGAT  
TACTGCCCCCCCCCTCCTGCACCAGTGCTGGCTTCTGCAGAATTA ACTGAAGTCATGCTTGGGTATTTTTTC  
TGAGGCGTTGTAAGCGGGAACCTCCGGCAAACCTTCCTTGAAAATGGGCCACAGGGGCAGCTGCACCTTTT  
AAAGTAAAGTAGTCTTTTACTACTTGTGCTTGAAACCCAGTTTCATTTTTTTATATTTTTTAAAAGCTCTT  
CATCTGCTACAGTCCAATGAGTATATGGATTTATTCCCAACTTAGCCAGTTGGCTATACCTAAAGTCATG  
AATCCTTGCAGCACTGTCAACAGCACTTTGCGGGGGCCCAGCTTGTAGCTCATTGCCAGGCCCAACATAG  
TTAGTACCGGGTAGTTGTACGCTA ACTTGCCAGGCTTGTGTAAGTCTTCACTAGATAATACTGCATTTTT  
CTCCTCTAGGTTCTGCATGACTGCTACTGGATGATAAGGCATGGGGGTGGTCAGATAACTGTCCATGACT

2101

TTGAAAATGATGACTATATAAGTCTGGAGAGTTTTTAAGGTTATTTTTAATACGAGCAACTAAGTCAAAC  
AGAGAGGATGGGTTTTCTAGGGGATTATCTAAAGAAATATTATAATGATCTTTTAATATTTGAATAAGCT  
CTAAGTCTGTTCCAGTAACCTTTTCATAAAATTCCACAAATTGCTGATACACAGCTTTAGCAAATTTATC  
ATCACTTTCCACCATTTGCCACTTTTCTTACTCATATtatgtatatctccttcttaaaggttaaacaaaa  
ttatcttagaggggaattgttatccgctcacaattcccctatagtgagtcgtattaatttcgcgggatc  
gagatctcgatcctctacgcggacgcatcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcgg.....

## pET11a-VP2 (sequenzierter Bereich)

VP2-PCR-Template: pcDNA3-VP1  
VP2-codierende Sequenz: 1665 – 1

verwendete Sequenzierprimer: 4B1, 4F1, 8B2, 8F1, T7-prom, T7-term

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX**  
– Start- bzw. Stopcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....ctttcgggctttgttagcagccggatccgcgacccatttgctgtccaccagtcattgctagc

1

**TT**ACAATGGGTGCACACGGCTTTTGGCTGTCCACAATTCTTCAGGCTTTTCATATCCATGTCTGTGGTGT  
TGTTTTGCATCTGTAGCTGTGGGGTCATATAGTACATATGGTAAATGACCTGCTGCGTGCGGGGGATATA  
CTCCAGGTTGAGGATTCCACCGTCCCGTAGCTTTACGGGGCCCCAATTTAAATGTCATAGTTACTGTCAT  
AATTTCCACGGCATACTGAACTAAGGTAGTAATTTCCATTGATTTAATACTCCAATTGGCCCACTTTGT  
GGTAATATTTTTTAAAAATATTTGAGGAGGTGGCTGATGCAAACCCATCCTCCTAAGGCTGCAAACCTGAG

TTTTAAACTGTCATCTAAATTTGGAATTTTACTCCACAGCTGGCTTTCATAGTGAAGGGCTCTTCTGTT  
CCATACAGAACCCACCATTAGGGGGCGCTCAATTTGATCTGTATATTGCTGGGTTCTTTATTGGGAAAG  
TAGGTGTGCATGTTTAAACCCTGTAACCTGTTTGTAGCTGTTCTTTTTCATTTGGAAATCTACCCACTCCTT  
GCTGATACTCTTTGTCTTCAGCGTTACCATAAGTGGTCTGACCATGAGAAATGGCATTTATTCTCTGTGAC  
ATATTTATCTGTGTCCAGTGGTGGTATGGCTGAGACACTGGCCCAGGGCGTAAGGATATTCTAGTGTTT

701

TGAGAGGTACCTGTGCTAAGGCCTGTTAAGGCTTTTCCAGCTCCAGTATTAGAGCTGTCTCCCTCCTTTG  
TAGACACTGAGTTTACTAGTGGCCCTGGCATGAAGTTTTGGGGCTGAATTGCATGGTCTTCATGTGTTAA  
AGATCTAAATTTTGGGTACCTCCTAATGTGTGAGGAACCCCTAAGCGGGATCCGTATAAGGGGTTGTAC  
ATTTTCATAAAAGTGTGACTGCAGCCCTCTAAATTTTCTGGGGGCACTGGAGGAAACTTATAAGACATAG  
**T**TGCTGTACCTCCTGTACCTAAAAGCTGAAAAGAACTGTGTTCCAAAACATAAAATGCTGATTCTTCACT  
TGCTAATTTTTTGTGTCTCCAGAAATTCCTTGTGTGTTAACATCTCCTACTGTTAAGTAAGCATATTGA  
GGGGGAAAGTATACCCAAATAGGAAGTTCTGGGGCTAAAGTATCCTGACCTTGCCCTAACACATATGGGT  
ACTTGTATTTCATGGTCTACTAACATGCATAGGCGCCCTGTAGTGCTGTGAGTAACCTGTACCCCCCTCC  
AGTTTTGTCTGTAACATCCTTAACAGCAATTTCTGATATGGTTACAGTTAAAGCATCAGGAGCTATACTT  
CCATAATTTTCAATTAAGTGCTGAAACTCTAAAGGTGAAAAAAATAAATTTAAAGCATTAAAAATCTAAAT

1401

ATCTCCATGGGGTTGAGTATCCATTATGGGACT**AA**TG**TT**GCAAACCTTTGCCTCCTTTCCACTGGCATT  
GTGGCAGCTACT**TG**CTGCGGGAGAAAACACCTTATAATGGTGCTCTGGGTCATATGGAATTAAAACTGT  
CTGGAAATGT**G**CAAGTTACAGAGTT**GG**CACTAAAAGTGGCCCCCTCACTCCACATGCTTTTGACAG**GAT**  
TACTGCCCCCCCCCTCCTGCACCAAGTGCTGGCTTCTGCAGAATTAAGTGAAGT**CATAT**tatgtatatctcc  
ttcttaaaggttaaacaaaattatcttagaggggaattg.....

## pFastBac Dual-Derivate

### pfbdual-VP2 (sequenzierter Bereich)

VP2-PCR-Template: pcDNA3-VP1  
VP2-codierende Sequenz: 1 - 1665

verwendete Sequenzierprimer: 3B1, 4B1, 4B2, 8B2, 8F1, duprom\_f, duprom\_b

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX**  
– Start- bzw. Stopcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....tctggaaggcgagcatcgtttggtcgcccaggactctagctatagttctagtgggtggcctacg  
taccgtagtggctatggcagggcttgccgccccgacgttggtgctgcgagccctgggccttcacccgaact  
tgggggttggggtggggaaaaggaagaaacgcgggcgtattgggtcccaatggggtctcggtgggggtatcg  
acagagtgccagccctgggaccgaaccccgcggttatgaacaaacgacccaacacccgtgcgtttttatct  
tgtctttttatttgccgtcatagcgcggttccttcgggtattgtctccttcogtgtttcagttagcctcc



cccatctccccggtaccgcatgctatgcatcagctgctagcaccatggctcgagatccccgggtgatcaagt  
cttcgctcgagtgattgtaaataaaatgtaatttacagtatagtattttaattaataacaaatgatttga  
taataattcttatttaactataatatattgtgttgggttgaattaaagggtccgtataactccggaatatta  
atagatcatggagataaattaaaatgataaccatctcgaaataaataagtattttactgttttcgtaaca  
gttttgaataaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggtatcccg  
gtccgaagcgcgcggaattcaaaggcctacgtcgacgagctcactagtcgcgggcggttttcgaatctaga

1

**ATG**ACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**C**CTGTCAAAAGCA  
TGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTAGTGCC**C**AACTCTGTAACCTTG**C**ACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCC  
ATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGC**A**AGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAG  
GAGGCAAAGGTTTGCACCAT**T**AGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATG  
CTTTAAATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGA  
TGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACAGACAAAACCTGGAGGGGGGGTACAG  
GTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAG  
GGCAAGGTCAGGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTT  
AACAGTAGGAGATGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCA  
TTTTATGTTTTTGAACACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCA**A**CTATGTCTTATAAGT

701

TTCTCCAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACA**C**CCCTTATA  
CGGATCCCGCTTAGGGGTTCCTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGAC  
CATGCAATTCAGCCCCAAAACCTTCATGCCAGGGCCACTAGTAAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACA  
GCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACAGGCCTTAGCACAGGTACCTCTCAAAACACTAGAATATC  
CTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCATACCACCACTGGGACACAGATAAATATGTCACAGGAATAAAT  
GCCATTTCTCATGGTCAGACCACTTATGGTAACGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGAT  
TTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAACAGTTACAGGGTTTAAACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGG  
AACCAGCAATATACAGATCAAATTGAGCGCCCCCTAATGGTGGGTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTT  
CACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTCCAAATTTAGATGACAGTTTTTAAACTCAGTTTGCAGCCT  
TAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTTAAAAATATTACCACAAAGTGGGCCAAT

1401

TGGAGGTATTAAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTAGTATGCCGTGGGAATTATGACAGTAACTATG  
ACATTTAAATTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAATCCTCAACCTGGAGTATATCCCCCGCAGC  
CAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAAACAACACCACAGACATGG  
ATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTG**Taag**cttgctcgagaagta  
ctagaggatcataatcagccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctc  
cccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgaacttgtttattgcagcttataatggtt  
acaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgtggtt

gtccaaactcatcaatgtatctttatcatgtctggatctgatcactgcttgagcctaggagatccgaacca  
gataagt.....

### pfbdual-VP12 (sequenzierter Bereich)

VP1-PCR-Template: pcDNA3-VP1  
VP1-Translationsstart: 2346  
VP2-Translationsstart: 2722

verwendete Sequenzierprimer: duprom\_f, duprom\_b

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX** – Startcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....TAGATAATACTGCATTTT  
CTCCTCTAGGTTCTGCATGACTGCTACTGGATGATAAGGCATGGGGTGGTCAGATAACTGTCCATGACT

2101

TTGAAAATGATGACTATATAAGTCTGGAGAGTTTTTAAGGTTATTTTAAATACGAGCAACTAAGTCAAAC  
AGAGAGGATGGGTTTTCTAGGGGATTATCTAAAGAAATATTATAATGATCTTTTAATATTTGAATAAGCT  
CTAAGTCTGTTCCAGTAACCTTTTCATAAAATTCCACAAATTGCTGATACACAGCTTTAGCAAATTTATC  
ATCACTTTCCACCATTGTCACCTTTCTTTACT**CAT**ttctcgagatcccgggtgatcaagtcttcgtcga  
gtgattgtaaataaaatgtaatttacagtatagtattttaattaatatacaaatgatttgataataattc  
ttatttaactataatataattgtgttggttggaattaaagggtccgtataactccggaatattaatagatcat  
ggagataattaaaatgataaccatctcgcaataaataagtattttactgttttcgtaacagttttgtaa  
taaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggatcccgggtccgaagc  
gcgcggaattcaaaggcctacgtcgacgagctcactagtcgcggccgctttcgaatctaga**ATG**ACTTCA  
GTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**CCT**GTCAAAAGCATGTGGAGTG

2801

AGGGGGCCACTTTTAGTGCC**CA**ACTCTGTA**ACT**TG**CAC**ATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCATATGACCC  
AGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGC**AA**GTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAGGAGGCAAAG  
GTTTGCACCAT**T**AGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCTTTAAATT  
TATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGATGCTTTAAC  
TG.....

### pfbdual-VP12mut1 (sequenzierter Promoterbereich)

VP1-Translationsstart: 2346  
VP2-Translationsstart: 2722  
mut1\_polh (HindIII): 2537 - 2546

verwendete Sequenzierprimer: duprom\_f, duprom\_b

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX** – Startcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....TTATATTTTTTAAAAGCTCTT  
CATCTGCTACAGTCCAATGAGTATATGGATTTATTCCCAACTTAGCCAGTTGGCTATACCTAAAGTCATG  
AATCCTTGCAGCACTGTCAACAGCACTTTGCGGGGGCCCAGCTTGTAGCTCATTGCCAGGCCCAACATAG  
TTAGTACCGGGTAGTTGTACGCTAACTTGCCAGGCTTGTGTAAGTCTTCACTAGATAATACTGCATTTT  
CTCCTCTAGGTTCTGCATGACTGCTACTGGATGATAAGGCATGGGGGTGGTCAGATAACTGTCCATGACT

2101

TTGAAAATGATGACTATATAAGTCTGGAGAGTTTTTAAGGTTATTTTTAATACGAGCAACTAAGTCAAAC  
AGAGAGGATGGGTTTTCTAGGGGATTATCTAAAGAAATATTATAATGATCTTTTAATATTTGAATAAGCT  
CTAAGTCTGTTCCAGTAACCTTTTCATAAAATTCACAAATTGCTGATACACAGCTTTAGCAAATTTATC  
ATCACTTTCCACCATTGCGCACTTTCTTTACT**CAT**ttctcgcagatccccgggtgatcaagtcttcgctcga  
gtgattgtaaataaaatgtaatttacagtatagtattttaattaataatacaaatgatttgataataattc  
ttatttaactataataatattgtgttggttgtaattaaagggtccgtataactccggaatattaatagatcat  
ggagataattaaaatgCC**AAGCTT**GGcgcaaataaataagtatctttactgttttcgtaacagttttgtaa  
taaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggtatcccggtccgaagc  
gcgcggaattcaaaggcctacgtcgacgagctcactagtcgcggccgctttcgaatctaga**ATG**ACTTCA  
GTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**C**CTGTCAAAGCATGTGGAGTG

2801

AGGGGGCCACTTTTAGTGCC**CA**ACTCTGTAAGTTG**C**ACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCATATGACCC  
AGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCT.....

### pfbdual-VP12mut2 (sequenzierter Promoterbereich)

VP1-Translationsstart: 2346  
VP2-Translationsstart: 2722  
mut2\_p10: 2456 - 2454

verwendete Sequenzierprimer: duprom\_f, duprom\_b

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX** – Startcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....AAGCTCTT  
CATCTGCTACAGTCCAATGAGTATATGGATTTATTCCCAACTTAGCCAGTTGGCTATACCTAAAGTCATG  
AATCCTTGCAGCACTGTCAACAGCACTTTGCGGGGGCCCAGCTTGTAGCTCATTGCCAGGCCCAACATAG

TTAGTACCGGGTAGTTGTACGCTAACTTGCCAGGCTTGTGTAAGTCTTCACTAGATAATACTGCATTTT  
CTCCTCTAGGTTCTGCATGACTGCTACTGGATGATAAGGCATGGGGGTGGTCAGATAACTGTCCATGACT

2101

TTGAAAATGATGACTATATAAGTCTGGAGAGTTTTTAAGGTTATTTTTAATACGAGCAACTAAGTCAAAC  
AGAGAGGATGGGTTTTCTAGGGGATTATCTAAAGAAATATTATAATGATCTTTTTAATATTTGAATAAGCT  
CTAAGTCTGTTCCAGTAACCTTTTCATAAAATTCCACAAATTGCTGATACACAGCTTTAGCAAATTTATC  
ATCACTTTCCACCATTGCGCACTTTTTTTACT**CAT**ttctcgagatcccgggtgatcaagtcttcgtcga  
gtgattgtaaataaaatgtaatttacagtatagtattttaattaataatacaaatgatttgataataattc  
ttaCCAAactataatatattgtgttgggttgaaataaagggtccgtataactccggaatattaatagatcat  
ggagataattaaaatgataaccatctcgcaataaataagtatTTTactgttttcgtaacagttttgtaa  
taaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggatcccgggtccgaagc  
gcgcggaattcaaaggcctacgtcgacgagctcactagtcgcggccgctttcgaatctaga**ATG**ACTTCA  
GTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**C**CTGTCAAAAGCATGTGGAGTG

2801

AGGGGGCCACTTTTAGTGCCAACTCTGTAAGTGG**C**ACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCATATGACCC  
AGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCT.....

### pfbdual-VP12mut12 (sequenzierter Promoterbereich)

VP1-Translationsstart:	2346
VP2-Translationsstart:	2722
mut1_polh ( <u>HindIII</u> ):	2537 - 2546
mut2_p10:	2456 - 2454

verwendete Sequenzierprimer: duprom\_f, duprom\_b

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX**  
– Startcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....AGTAGTCTTTTACTACTTGTGCTTGAAACCCAGTTTCATTTTTTATATTTTTTAAAAGCTCTT  
CATCTGCTACAGTCCAATGAGTATATGGATTTATTCCCAACTTAGCCAGTTGGCTATACCTAAAGTCATG  
AATCCTTGCAGCACTGTCAACAGCACTTTGCGGGGGCCAGCTTGTAGCTCATTGCCAGGCCAACATAG  
TTAGTACCGGGTAGTTGTACGCTAACTTGCCAGGCTTGTGTAAGTCTTCACTAGATAATACTGCATTTT  
CTCCTCTAGGTTCTGCATGACTGCTACTGGATGATAAGGCATGGGGGTGGTCAGATAACTGTCCATGACT

2101

TTGAAAATGATGACTATATAAGTCTGGAGAGTTTTTAAGGTTATTTTTAATACGAGCAACTAAGTCAAAC  
AGAGAGGATGGGTTTTCTAGGGGATTATCTAAAGAAATATTATAATGATCTTTTTAATATTTGAATAAGCT  
CTAAGTCTGTTCCAGTAACCTTTTCATAAAATTCCACAAATTGCTGATACACAGCTTTAGCAAATTTATC  
ATCACTTTCCACCATTGCGCACTTTTTTTACT**CAT**ttctcgagatcccgggtgatcaagtcttcgtcga

gtgattgtaaataaaatgtaatttacagtatagtattttaattaatatacaaatgatttgataataattc  
ttaCCAaactataatataattgtgttgggttgaattaaaggtccgtataactccggaatattaatagatcat  
ggagataattaaaatgCC**AAGCTT**GGcgcaaataaataagatattttactgttttcgtaacagttttgtaa  
taaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtcccaccatcgggcgcggaatcccggtccgaagc  
gcgcggaattcaaaggcctacgtcgacgagctcactagtcgcggccgctttcgaatctaga**ATG**ACTTCA  
GTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGGCAGTAAT**CCT**GTCAAAAGCATGTGGAGTG

2801

AGGGGGCCACTTTTAGTGCC**CA**ACTCTGTA**ACTTG****C**ACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCATATGACCC  
AGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCT.....

## **pTYB1-Derivate**

### **pTYB1-hiv**

*HIV-gag-Domäne:*

1 - 1647

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen.

.....gaattc

1

GGATCCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAA  
GGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCG  
AGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTT  
CAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGA  
TAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGC  
ACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAGCCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATC  
CAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGA  
AGGCTTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAA  
CACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAA  
GCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAA

701

GGGGAAGTGACATAGCAGGAACACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATAATCCACC  
TATCCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGC  
CCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATA  
AAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAA  
TGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAGCATTGGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATGACA  
GCATGTCAGGGAGTGGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAA  
ATTCAGCTACCATAATGATGCAAAGAGGCAATTTTAGGAACCAAGAAAGATTGTTAAGTGTTCATTG  
TGGCAAAGAAGGGCACATAGCCAGAAATTGCAGGGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAG

GAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACA  
AGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTC

1401

TGGGGTAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCC  
CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAAGGAAGCTCTATT  
AGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAGTTTGCCAGGAAGATGGAAAACAAAAATGATA  
GGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACT*tctcgag*.....

### pTYB1-VP2 (sequenzierter Bereich)

VP2-PCR-Template:	pUC18-VP1
VP2-codierende Sequenz:	1-1662
Inteinstart:	1663

verwendete Sequenzierprimer: 3B1, 4B1, 8F1, 8B2, 9F2, T7-universal, pET-intein

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX**  
– Start- bzw. Stopcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

...cggaattaattcccgggtttaaacggggatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggg  
aattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttggttaactttaagaaggagatatacaTAAT

1

**ATG**ACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**CCT**GTCAAAAGCA  
TGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTAGTGCC**CA**ACTCTGTAACTTG**CAC**ATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCC  
ATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGC**AA**GTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAG  
GAGGCAAAGGTTTGACCAT**TAG**TCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATG  
CTTTAAATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGA  
TGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACAGACAAAACCTGGAGGGGGGGTACAG  
GTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAG  
GGCAAGGTCAGGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTT  
AACAGTAGGAGATGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCA  
TTTTATGTTTTGGAACACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCATCTATGTCTTATAAGT

701

TTCTCCAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATA  
CGGATCCCGCTTAGGGGTTCTTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGAC  
CATGCAATTCAGCCCCAAACTTCATGCCAGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACA  
GCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACAGGCCTTAGCACAGGTACCTCTCAAAACACTAGAATATC  
CTTACGCCCTGGG**C**CAGTGTCTCAGCCATAACCACCTGGGACACAGATAAAATATGTACAGGAATAAAT  
GCCATTTCTCATGGTCAGACCACTTATGGTAACGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGAT

TTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAACAGTTACAGGGTTTAAACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGG  
 AACCCAGCAATATACAGATCAAATTGAGCGCCCCCTAATGGTGGGTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTT  
 CACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTCCAAATTTAGATGACAGTTTTAAACTCAGTTTGCAGCCT  
 TAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTTAAAAATATTACCACAAAGTGGGCCAAT

1401

TGGAGGTATTAAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTTCAAGTATGCCGTGGGAATTATGACAGTAACTATG  
 ACATTTAAATTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGGAATCCTCAACCTGGAGTATATCCCCCGCAGG  
 CAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAAACAACACCACAGACATGG  
 ATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAGCCGTGTGCACCCATTGTgcttttgccaaggggtacc  
 aatgttttaatggcggtggtctattgaatgtattgaaaacattgaggttggttaataaggtcatgggta  
 aagatggcagacctcgtgaggttaattaaattgcccagaggaagagaaactatgtacagcgctcgtg.....

### pTYB1-VP2gly (sequenzierter Bereich)

VP2-PCR-Template:	pUC18-VP1
VP2-codierende Sequenz:	1-1662
Glycincodon:	1663 - 1665
Inteinstart:	1666

verwendete Sequenzierprimer: 3B1, 4B1, 4F1, 8F1, 8B2, 9F2, T7-universal,  
 pET-intein

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX**  
 – Start- bzw. Stopcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....aggggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggaattggg  
 gatcgggaattaattcccgggtttaaccggggatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggg  
 aattgtgagcggataacaattcccctctagaataatttgtttaactttaagaaggagatatacaTAAT

1

**ATG**ACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**CCT**GTCAAAAGCA  
 TGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTAGTGCC**CA**ACTCTGTA**ACTTG****C**ACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCC  
 ATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGC**A**AGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAG  
 GAGGCAAAGGTTTGCACCAT**T**AGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATG  
 CTTTAAATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTT**C**AGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGA  
 TGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACAGACAAA**ACT**GGAGGGGGGGTACAG  
 GTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAG  
 GGCAAGGTCAGGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTT  
 AACAGTAGGAGATGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCA  
 TTTTATGTTTTGGAACACAGTTCTTTT**C**AGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCATCTATGTCTTATAAGT

701

TTCCTCCAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATA  
CGGATCCCGCTTAGGGGTTCTTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGAC  
CATGCAATTCAGCCCCAAAACCTTCATGCCAGGGCCACTAGTAAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACA  
GCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACAGGCCTTAGCACAGGTACCTCTCAAAAACACTAGAATATC  
CTTACGCCCTGGG**C**CAGTGTCTCAGCCATAACCACCACTGGGACACAGATAAAATATGTCACAGGAATAAAT  
GCCATTTCTCATGGTCAGACCACCTTATGGTAACGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGAT  
TTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAACAGTTACAGGGTTTAAACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGG  
AACCCAGCAATATACAGATCAAATTGAGCGCCCCCTAATGGTGGGTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTT  
CACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAATTCCAAATTTAGATGACAGTTTTTAAAACTCAGTTTGCAGCCT  
TAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCT**CCT**CAAATATTTTTTAAAAATATTACCACAAAAGTGGGCCAAT

1401

TGGAGGTATTAAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTTCAAGTATGCCGTGGGAATTATGACAGTAACTATG  
ACATTTAAATTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGGAATCCTCAACCTGGAGTATATCCCCGCACG  
CAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAAACAACACCACAGACATGG  
ATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTG**GGT**Tgctttgccaaggg  
accaatggttttaatggcgatgggtctattgaatgtattgaaaacattgaggttggttaataaggtcatgg  
gtaaagatggcagacctcgtgaggttaattaaattgcccagaggaagagaaaactatgtacagcgctcgtgca  
gaaaagtcagcacagagcccacaaaagtgaactcaagtcgtgaagtgccca.....

## pQE40-Derivate

### **pQE40-Ascl**

Ascl-Schnittstelle: **15 - 22**

verwendete Sequenzierprimer: 3B1, 4B1, 4F1, 8F1, 8B2, 9F2, T7-universal,  
pET-intein

xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen.

1

gGATCCAATCGATT**GGCGCGCC**GAACTGGAGCGGCCGCTATCATTCGAGTGGTCACTGGTACc.....

### **pQE40-VP2 (sequenzierter Bereich)**

VP2-PCR-Template	pUC18-VP1
VP2-codierende Sequenz	1 - 1665
[6xHis]-codierende Sequenz	<b>39 - 22</b>

verwendete Sequenzierprimer: 4F2, 8B2, 8F2, 9F2, QE-VP2\_2, QE-prom



xxx – Original-Vektorsequenz, XXX – inserierte Sequenz, XxX – Klonierungsschnittstellen, **XxX** – Start- bzw. Stopcodon, **XxX** – Nukleotidaustausche gegenüber pYT103-Standardsequenz.

.....ttattatcatgacatta  
acctataaaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtcttcacctcgagaaatcataaaaaatttattttgc  
tttgtgagcggataacaattataatagattcaattgtgagcggataacaatttcacacagaattcattaa  
agaggagaaattaact**atg**agaggatcgcatcaccatcaccatcadggatccaatcgattggcgcgccGC

1

ATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGCAGTAAT**CT**TGTCAAAAGCA  
TGTGGAGTGAGGGGGCCACTTTTAGTGCC**CA**ACTCTGTAACCTTG**CA**CATTTTCCAGACAGTTTAAATTCC  
ATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGC**A**AGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAG  
GAGGCAAAGGTTTGCACCAT**T**AGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATG  
CTTTAAATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTATAGCTCCTGA  
TGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACAGACAAA**ACT**GGAGGGGGGTACAG  
GTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATGTTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAG  
GGCAAGGTCAGGATACTTTAGCCCCAGAACTTCCTATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTT  
AACAGTAGGAGATGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAAATTAGCAAGTGAAGAATCAGCA  
TTTTATGTTTTGGAACACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTACAGCA**ACT**ATGTCTTATAAGT

701

TTCTCCAGTGCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACA**ACC**CTTATA  
CGGATCCCGCTTAGGGGTTCCTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGAC  
CATGCAATTCAGCCCCAAA**ACT**TCATGCCAGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACA  
GCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACAGGCCTTAGCACAGGTACCTCTCAAAACACTAGAATATC  
CTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCATACCAC**ACT**GGGACACAGATAAAATATGTCACAGGAATAAAT  
GCCATTTCTCATGGTCAGACCACTTATGGTAACGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGAT  
TTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAACAGTTACAGGGTTTAAACATGCACACCTACTTTCCCAATAAAGG  
AACCCAGCAATATACAGATCAAATTGAGCGCCCCCTAATGGTGGGTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTT  
CACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAATTCCAAATTTAGATGACAGTTTTAA**AACT**CAGTTTGCAGCCT  
TAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCCTCAAATATTTTTAA**AAAT**ATTACCACAAAGTGGGCCAAT

1401

TGGAGGTATTAAATCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCAGTATGCCGTGGGAATTATGACAGTAACTATG  
ACATTTAAATTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAAATCCTCAACCTGGAGTATATCCCCGCACG  
CAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTACAGATGCAAAACAACACCACAGACATGG  
ATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACAGCCAAAGCCGTGTGCACCCATTG**TAA**AACTCcccggtcg  
acctgcagccaagcttaattagctgagcttggactcctggtgatagatccagtaatgacctcagaactcc  
atctggatttg.....

## **Danksagung**

*Mein Dank gilt zuallererst Prof. Dr. Robert Seckler für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Betreuung dieser Arbeit. Trotz der räumlichen Entfernung konnte ich mich immer der Arbeitsgruppe Seckler zugehörig fühlen und fand jederzeit ein offenes Ohr bei der Suche nach Problemlösungen. Herzlichen Dank auch für die Unterstützung bei der Erstellung dieses Manuskriptes.*

*Prof. Dr. Susanne Modrow danke ich für meine „Adoption“ in ihrer Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des modernen Arbeitsplatzes am „Pulsschlag der Parvovirusforschung“ am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg und für die finanzielle Unterstützung bei nationalen und internationalen Kongressteilnahmen.*

*Ich möchte mich bei meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Seckler, allen „Modrow-Weibern“ und vielen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen am Regensburger Institut bedanken, die für ein angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Mein Dank geht stellvertretend an Karin Beckenlehner, Andrea Hemauer, Jürgen Kern, Albert Kroen und Ulla Raab für fruchtbare Diskussionen oder praktische Hilfe in und um die Arbeit. Alle nicht-namentlich Genannten mögen mir verzeihen, aber die Liste der Namen würde einfach zu lang.*

*Besonders dankbar bin ich Ulrich Baxa für seine Unterstützung bei biophysikalischen Messungen im Seckler'schen Labor und in Momenten, in denen mich der nicht fassbare Parvovirus-Rezeptor-Kontakt zur Verzweiflung trieb. Bei Monika Walter bedanke ich mich herzlich für das „Dach über dem Kopf“, das sie mir bei meinen arbeitstechnischen Besuchen in Luckenwalde und Potsdam gewährt hat, für die lustigen Stunden außerhalb des Laboralltags und für ihre hilfreichen Hände bei abschließenden densitometrischen Auswertungen.*

*Dr. Reinhard Rachel danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.*

*Hier an letzter Stelle, aber von oberster Priorität ist mein herzlicher Dank an meine Eltern und Frank, die mich moralisch, finanziell und vor allem geduldig unterstützt haben.*